

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

**EFICÁCIA DE SANITIZANTES E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA
DE *Salmonella* HEIDELBERG ISOLADAS DE FONTES AVÍCOLAS EM 2006 E
2016**

Dissertação de Mestrado

Juliana Bassani

Porto Alegre
2017

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

**EFICÁCIA DE SANITIZANTES E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA
DE *Salmonella* HEIDELBERG ISOLADAS DE FONTES AVÍCOLAS EM 2006 E
2016**

Autora: Juliana Bassani

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Sanidade Avícola

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

Porto Alegre
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Bassani, Juliana

Eficácia de sanitizantes e susceptibilidade antimicrobiana de Salmonella Heidelberg isoladas de fontes avícolas em 2006 e 2016 / Juliana Bassani. -- 2017.

66 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Salmonella Heidelberg. 2. Avicultura. 3. Sanitizantes. 4. Antimicrobianos. I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, orient. II. Título.

Juliana Bassani

EFICÁCIA DE SANITIZANTES E SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE
Salmonella HEIDELBERG ISOLADAS DE FONTES AVÍCOLAS EM 2006 E 2016

Aprovado em 26 de abril de 2017

APROVADO POR:

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Benito Guimarães Brito
Membro da Comissão

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

Prof. Dra. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de poder conviver com tantas pessoas de bem e que realmente fizeram e fazem a diferença na minha vida. Aqui fica apenas um pequeno registro da minha eterna gratidão.

Aos meus pais, Elói e Genair, que apesar da distância nunca deixaram de se preocupar com meu bem-estar e sempre estiveram a postos para me auxiliar, independentemente de qualquer que fosse a situação.

Às minhas irmãs, Andréia e Adriana, que sempre foram fonte de força e sustentação na minha trajetória, me aconselhando e amparando nos momentos difíceis pelos quais passei e comemorando comigo as vitórias que alcancei. Também me deram três anjos, Joana, Felipe e Joaquim, possibilitando que eu conhecesse o amor em sua forma mais pura e profunda.

Ao meu companheiro, amigo e grande confidente, Antognionni, pelo amor incondicional, paciência e conselhos ofertados. Mas principalmente por me incentivar nas horas de desânimo e me acalmar nas horas de desespero. Sem você nada seria possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento, pelo voto de confiança na realização deste trabalho, mesmo sem me conhecer.

À toda equipe do CDPA, colegas, professores e funcionários, pela recepção, conversas, rodas de chimarrão e por todo o conhecimento compartilhado.

À toda equipe do Laboratório Porto Belo que considero uma grande família, em especial Marita e Ana, que me deram a primeira oportunidade profissional e que nunca deixaram de oferecer ajuda e apoio em todas as minhas decisões. Minha estadia em Porto Alegre foi muito feliz durante o período que passei com vocês.

A todos, muito obrigada!

RESUMO

O Brasil é hoje o segundo maior produtor de carne de frango do mundo e o primeiro país exportador, o que faz com que as criações avícolas necessitem de um criterioso programa de biossegurança a fim de impedir o surgimento de patógenos que possam causar danos aos plantéis e ao produto final. Neste cenário, tem fundamental importância a *Salmonella* e, mais recentemente, a *Salmonella* Heidelberg por sua alta prevalência e importância frente a casos de saúde pública, principalmente no que diz respeito à resistência a sanitizantes e antimicrobianos. A dificuldade no combate e eliminação desse patógeno em toda a cadeia avícola, seu potencial zoonótico e aumento de resistência a antimicrobianos motivou a realização deste trabalho. Portanto, os objetivos foram comparar 20 isolados de *S. Heidelberg* do ano de 2006 e 20 isolados do ano de 2016, testando-os quanto à eficácia de dois sanitizantes, hipoclorito de sódio (concentrações 0,5% e 1,0%) e cloreto de benzalcônio (concentrações 100 ppm e 200 ppm), em temperatura de 25°C e 12°C e tempos de contato de 5 e 15 minutos. Ainda, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos antimicrobianos ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacina, gentamicina e tetraciclina, além de verificar a presença de isolados multirresistentes. O teste de suspensão por diluição dos sanitizantes revelou que, nas duas concentrações utilizadas, independentemente do ano de isolamento, o hipoclorito de sódio se mostrou mais eficiente do que o cloreto de benzalcônio, eliminando 100% dos isolados com tempo de contato de 15 minutos. Por outro lado, o cloreto de benzalcônio, mesmo na maior concentração e tempo de contato, não foi totalmente eficiente para os isolados de 2006 e 2016. O cloreto de benzalcônio foi mais eficiente a 25°C do que a 12°C, em ambos os períodos e, quando comparados os anos, os isolados de 2016 foram mais resistentes ao cloreto de benzalcônio a 200 ppm, 25°C e tempo de contato de 5 minutos. Nos teste de MIC, quando comparados os dois períodos, 2006 e 2016, houve aumento significativo de isolados categorizados como nWT à tetraciclina, passando de 5% em 2006 para 75% em 2016. Nos dois períodos foi observada uma alta taxa de isolados nWT para ácido nalidíxico (50% e 65%), porém, todos os isolados foram categorizados como WT ao cloranfenicol e à enrofloxacina. Dentre os isolados de 2016, 5 (25%) apresentaram fenótipo de multirresistência. Os isolados sensíveis a todos os antimicrobianos totalizaram 40% para 2006 e 20% para 2016. Os resultados encontrados demonstram que há progressão da resistência de *S. Heidelberg* aos antimicrobianos com o passar do tempo, o que implica no aparecimento de isolados multirresistentes. Ações devem ser tomadas com o intuito de incentivar o uso prudente desses fármacos na medicina humana e, principalmente, em qualquer que seja a área de produção animal.

Palavras-chave: *Salmonella* Heidelberg; avicultura; sanitizantes; antimicrobianos; resistência; multirresistentes.

ABSTRACT

Brazil is now the second largest producer of chicken meat in the world and the first exporting country, which means that poultry farms need a careful biosecurity program to prevent the emergence of pathogens that can cause damage to the farms and to the final product. In this scenario, Salmonella Heidelberg plays a fundamental role because of its high prevalence and significance in public health cases, especially with regard to resistance to sanitizers and antimicrobials. Motivated by the difficulty in eliminating this pathogen throughout the poultry chain, its zoonotic potential and increased antimicrobial resistance, this study aimed to compare 20 isolates of S. Heidelberg from the year 2006 and 20 isolates from the year 2016. The isolates were tested against the efficacy of two sanitizers, sodium hypochlorite (0.5% and 1.0% concentrations) and benzalkonium chloride (concentrations of 100 ppm and 200 ppm), at 25°C and 12°C, and contact times of 5 and 15 minutes. In addition, the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of the antimicrobials nalidixic acid, ciprofloxacin, chloramphenicol, enrofloxacin, gentamicin and tetracycline were determined, as well as the presence of multiresistant isolates. The dilution suspension test of the sanitizers revealed that in the two concentrations used, sodium hypochlorite was more efficient than benzalkonium chloride, eliminating 100% of the isolates with a contact time of 15 minutes, regardless of the year of isolation. On the other hand, benzalkonium chloride, even at the highest concentration and contact time, was not fully efficient for the isolates of 2006 and 2016. Benzalkonium chloride was more efficient at 25°C than at 12°C in both periods. When the years were compared, the isolates from 2016 were more resistant to benzalkonium chloride at 200 ppm, 25°C and contact time of 5 minutes. In the MIC tests, when comparing the two periods of 2006 and 2016, there was a significant increase of isolates categorized as nWT to tetracycline, from 5% to 75%. In both periods, a high rate of nWT isolates for nalidixic acid (50% and 65%) was observed. All isolates were categorized as WT to chloramphenicol and 5nrofloxacin. Among the isolates from 2016, five (25%) had a multidrug resistance phenotype. Forty percent of isolates from 2006 and 20% from 2016 were sensitive to all antimicrobials tested. The results show that there is progression of resistance of S. Heidelberg to antimicrobials over time, which implies the appearance of multiresistant isolates. Actions should be taken in order to encourage the prudent use of these drugs in human medicine and veterinary.

Keywords: Salmonella Heidelberg; poultry farming; sanitizers; antimicrobials; resistance; multiresistant.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Principais modos de ação de antimicrobianos sobre bactérias	27
FIGURA 2 – Estrutura geral de um integron classe 1	29
FIGURA 3 – Porcentagem de isolados de <i>S. Heidelberg</i> nWT em 2006 e 2016	41

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	– Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações e valores de ECOFF e de <i>breakpoint</i>	32
TABELA 2	– Número de isolados de <i>S. Heidelberg</i> resistentes ao hipoclorito de sódio por concentração, temperatura e tempo de contato	35
TABELA 3	– Número de isolados de <i>S. Heidelberg</i> resistentes ao cloreto de benzalcônio a $12 \pm 1^\circ\text{C}$	36
TABELA 4	– Número de isolados de <i>S. Heidelberg</i> resistentes ao cloreto de benzalcônio a $25 \pm 1^\circ\text{C}$	36
TABELA 5	– Resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados de <i>S. Heidelberg</i> do ano de 2006 frente aos diferentes antimicrobianos avaliados	38
TABELA 6	– Resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados de <i>S. Heidelberg</i> do ano de 2016 frente aos diferentes antimicrobianos avaliados	39
TABELA 7	– Distribuição dos perfis fenotípicos de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>S. Heidelberg</i> nos anos de 2006 e 2016 ..	40

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
APT	Água Peptonada Tamponada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Antimicrobiano
BHI	<i>Brain-Heart Infusion Broth</i>
BPF	Boas Práticas de Fabricação
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
BSAC	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherapy</i>
CAMBH	<i>Cation Adjusted Muller Hinton Broth</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CIP	Ciprofloxacina
CL	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CS	Sequência Conservada
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
ECOFF	<i>Epidemiological cut-off</i>
ENO	Enrofloxacin
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GEN	Gentamicina
HOCI	Ácido Hipocloroso
IN	Instrução Normativa
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg/mL	Miligramas por Mililitro
MIC	Concentração Inibitória Mínima

mL	Mililitro
NaCl	Cloreto de Sódio
NaClO	Hipoclorito de Sódio
NAL	Ácido Nalidíxico
nm	Nanômetro
nWT	<i>Non-wild Type</i>
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
ppm	Partes por Milhão
R	Resistente
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TET	Tetraciclina
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia por Mililitro
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	<i>Wild Type</i>
XLD	<i>Xylose Lysine Deoxycholate Agar</i>
µg/mL	Microgramas por Mililitro
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	O gênero <i>Salmonella</i>	13
2.2	Importância da <i>Salmonella</i> em saúde pública	14
2.3	<i>Salmonella</i> Heidelberg	15
2.4	<i>Salmonella</i> na cadeia avícola	17
2.5	Higienização nas instalações e indústria avícolas	17
2.6	Sanitizantes	20
2.6.1	Hipoclorito de Sódio	21
2.6.2	Cloreto de Benzalcônio	22
2.7	Resistência aos sanitizantes	22
2.8	Antimicrobianos	23
2.9	Resistência aos antimicrobianos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1	Local de estudo	29
3.2	Isolados de <i>S. Heidelberg</i>	29
3.3	Avaliação da eficácia dos sanitizantes	29
3.3.1	Sanitizantes e o preparo das diluições	29
3.3.2	Determinação da suspensão teste	30
3.3.3	Teste da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio	30
3.4	Concentração Inibitória Mínima (MIC) de antimicrobianos	31
3.4.1	Antimicrobianos e o preparo das soluções-estoque	31
3.4.2	Determinação da suspensão teste	32
3.4.3	Teste da concentração inibitória mínima	32
3.5	Análise estatística	33
4	RESULTADOS	34
4.1	Avaliação da eficácia dos sanitizantes	34
4.2	Concentração Inibitória Mínima (MIC) de antimicrobianos	36
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	APÊNDICE A – Isolados de <i>S. Heidelberg</i> : ano de isolamento e origem	66

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é hoje uma das maiores fontes de renda do Brasil, principalmente nas regiões sul e sudeste, onde se concentram os maiores percentuais de produtores de frango de corte do país. Segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2016), a atividade reúne mais de 3,5 milhões de trabalhadores, entre produtores, funcionários de empresas e profissionais vinculados direta e indiretamente ao setor. Em 2015, o país ultrapassou os 13,1 milhões de toneladas de carne de frango produzidas, consagrando-se como o segundo maior produtor de carne de frango do mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos, além de manter o posto de maior exportador mundial com cerca de 4,3 milhões de toneladas produzidas.

Tendo em vista a grande importância da produção brasileira de produtos de origem avícola e sua representatividade no que diz respeito à economia do país, levando em conta o mercado exportador e todas as suas restrições sanitárias impostas, faz-se necessário um adequado programa de medidas de controle e prevenção de agentes potencialmente zoonóticos e que contribuem para a queda na qualidade final do produto e lucratividade dos plantéis. Exemplo disso foi a implementação do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), instituído pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) no ano de 1994, cujas monitorias para diversos patógenos visam manter a saúde do plantel avícola. Além disso, os programas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e de qualidade como o Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), são essenciais para a obtenção de alimentos seguros quanto às contaminações com agentes químicos, físicos e microbiológicos, permitindo que o alimento mantenha suas características sensoriais e nutritivas.

Neste cenário, tem especial importância um patógeno que destaca-se não somente devido aos prejuízos econômicos que gera, mas também por sua importância em saúde pública. *Salmonella* spp., segundo a *World Health Organization* (WHO, 2016), é considerada uma das quatro principais causas globais de doenças diarreicas, atingindo aproximadamente 1 em cada 10 pessoas, totalizando cerca de 550 milhões de pessoas infectadas ao ano. Infelizmente, devido à deficiência de programas de controle em saúde pública no Brasil, esses dados são subestimados no país. Outro grande problema ocorre com o uso impróprio e indevido de antimicrobianos, tanto na medicina humana quanto na veterinária, que tem favorecido o aparecimento de cepas multirresistentes.

Nos últimos anos, o ressurgimento específico do sorovar Heidelberg e sua resistência a programas de tratamento tem preocupado autoridades no mundo inteiro. No Brasil, Back (2016) conduziu experimentos a campo na região sul que demonstraram que o sorovar Enteritidis, que foi o mais prevalente por anos, foi ultrapassado por *S. Heidelberg*. Das amostras coletadas, 44,7% foram positivas para *S. Heidelberg*, seguida por Muenchen (6,7%), Schwarzengrund (5,5%), Livingstone (3,6%), Senftenberg (2,4%), Minnesota (1,8%), Mbandaka (2,5%), Anatum (2,2%) e *S. Infantis* e *S. Agona*, ambas presentes em 1,9% das amostras.

Levando em conta o quadro epidemiológico que o Brasil enfrenta e na tentativa de se encontrar soluções para o combate à *S. Heidelberg* em todos os elos da cadeia avícola, o presente trabalho teve como objetivos verificar a eficácia de dois sanitizantes de uso rotineiro na indústria avícola, hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio, em isolados de *S. Heidelberg* dos anos de 2006 e 2016 provenientes de fontes avícolas da região sul do Brasil, através da técnica de diluição com teste de suspensão em células planctônicas. Além disso, verificou-se o perfil de susceptibilidade a seis antimicrobianos (ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacina, gentamicina e tetraciclina), pertencentes a quatro classes distintas de fármacos, utilizando a técnica de Concentração Inibitória Mínima (MIC), a fim de identificar uma possível progressão da resistência ao passar dos anos e a presença de isolados multirresistentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e foi descrito pela primeira vez em 1885 por Daniel Elmer Salmo, microbiologista veterinário do Departamento de Agricultura dos EUA (GAST, 2008). São classificadas como bacilos Gram-negativos curtos (1 a 2 μm), aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, sem cápsula, móveis (exceto *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*), com flagelos peritríquios, não formadoras de esporos e capazes de causar doenças tanto em humanos quanto em animais (FORSYTHE, 2002; GAST, 2008; RICHARDSON *et al.*, 2011). A temperatura de crescimento pode variar entre 5 e 45°C, porém 37°C é considerado o ideal para seu desenvolvimento. Já o pH varia entre 4 e 9, sendo 7 o ideal (D'AOUST; MAURER, 2007; GAST, 2008). A destruição do microrganismo pode ocorrer por aquecimento a 60°C por 15 a 20 minutos (FORSYTHE, 2013), enquanto que o processo de congelamento apenas reduz o número de células viáveis, não sendo capaz de provocar sua destruição completa (D'AOUST; MAURER, 2007).

As características bioquímicas do gênero *Salmonella* incluem a fermentação da glicose, resultando na produção de ácido e gás, utilização do citrato como fonte de carbono, descarboxilação da lisina e ornitina, redução do nitrato a nitrito, além de serem catalase positivas. Por outro lado, são incapazes de metabolizar a lactose e a sacarose, não produzem indol e não hidrolisam ureia (D'AOUST; MAURER, 2007; MARKEY *et al.*, 2013; TORTORA *et al.*, 2012).

Atualmente, duas espécies de *Salmonella* são reconhecidas: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo subdivididas em subespécies. *S. enterica* possui seis subespécies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI), enquanto que *S. bongori* possui apenas uma subespécie: *bongori* (V) (GRIMONT; WEILL, 2007).

Além da divisão em espécies e subespécies, as bactérias do gênero *Salmonella* também podem ser classificadas em sorovares através do esquema Kauffmann-White, tendo por base sua composição antigênica com relação aos seus antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (GRIMONT; WEILL, 2007; FORSYTHE, 2013; CAMPOS, 2015; PAIXÃO *et al.*, 2016). Os antígenos O são distinguidos por sua composição química variada e os antígenos H distinguem-se pela composição proteica dos flagelos (CDC, 2015). Quanto ao antígeno Vi, existe apenas um tipo sorológico, o qual é encontrado em

apenas três sorotipos de *Salmonella* (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin*) (CAMPOS, 2015). Portanto, os sorotipos são determinados baseados na combinação entre os antígenos, uma vez que cada antígeno O e H possui um código numérico único (CDC, 2015).

Segundo dados publicados pelo Instituto Pasteur, são reconhecidos 2.659 sorovares do gênero *Salmonella*, sendo 1.586 pertencentes à *Salmonella enterica* subesp. *enterica* (ISSENHUTH-JEANJEAN *et al.*, 2014). Também é dentro dessa espécie que estão contidos cerca de 99,5% dos sorovares mais comumente isolados, os quais são capazes de causar infecções em várias espécies animais e no homem e, apesar de sua estreita relação genética, demonstram uma variação quanto à sua especificidade frente a diferentes hospedeiros (CAMPOS, 2015).

O habitat natural da *Salmonella* pode ser dividido em três categorias de acordo com a especificidade do hospedeiro e o padrão clínico por ele determinado: altamente adaptadas ao homem (*S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C), agentes da febre entérica; altamente adaptadas aos animais: bovinos (*S. Dublin*), suínos (*S. Cholerasuis* e *S. Typhisuis*) e aves (*S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), responsáveis pelo paratifo animal; por fim, *Salmonellas* zoonóticas, as quais atingem o homem e os animais, e são responsáveis por doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo encontradas na maioria das espécies animais utilizadas como fonte de alimento pelos seres humanos, além de outros animais domésticos e silvestres (RODRIGUES, 2011).

Levando em conta que a principal via de transmissão da *Salmonella* está na cadeia alimentar, sua presença em animais de produção a classifica como um dos agentes etiológicos de maior incidência e relevância em enteroinfecções. Fato este que resulta na perda de milhões de dólares para a agroindústria (bovinos, suínos e aves), tanto para o mercado interno quanto para a exportação, uma vez que grande parte dos países importadores exige rigidez na inspeção e necessidade constante de qualidade (RODRIGUES, 2011).

2.2 Importância da *Salmonella* em saúde pública

Salmonella spp. é comumente encontrada no ambiente de produção animal e, consequentemente, pode ser isolada de alimentos de origem animal, tornando estreita sua relação com problemas de saúde pública. Dentre os alimentos com maior incidência de salmoneloses encontram-se os ovos, as carnes bovina e de aves e o leite (EFSA, 2014; WHO, 2016).

Em humanos, a salmonelose é uma das doenças zoonóticas mais comuns e economicamente importantes. Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2013), estima-se que mais de 1,2 milhões de casos de salmonelose ocorram a todo ano nos Estados Unidos, levando a mais de 23.000 hospitalizações e 450 mortes. A ingestão de 10^4 a 10^8 células viáveis é o suficiente para o desenvolvimento da doença clínica em indivíduos sadios (RODRIGUES, 2013).

O período de incubação pode variar em função da quantidade de células ingeridas e do sorotipo envolvido na infecção. As primeiras manifestações clínicas aparecem em torno 12 a 36 horas após a ingestão e incluem dor abdominal, diarreia (que pode durar até 7 dias), náuseas e vômito. Em alguns casos, a doença pode evoluir para uma infecção extra-intestinal, ocasionando quadros de septicemia, otite, osteomielite, artrite, hepatite, pneumonia, meningite entre outros (SCVPH, 2000; RODRIGUES, 2013). Um grande problema encontra-se no fato de que alguns indivíduos podem tornar-se portadores crônicos e carrear *Salmonella* por várias semanas ou até anos sem apresentar qualquer sintomatologia e, diante de situações estressantes, sofrer a reativação da multiplicação e excreção do agente (BARROW *et al.*, 2010).

Inúmeros programas nacionais e internacionais de vigilância epidemiológica foram criados a fim de estudar a epidemiologia da *Salmonella* e identificar padrões de resistência a antimicrobianos dos isolados ao longo do tempo, contribuindo assim para a identificação de fatores de risco e suas implicações em saúde pública (YAN *et al.*, 2003). Ainda que no Brasil os programas de controle e vigilância epidemiológica de DTAs sejam deficientes pois muitos casos não são notificados, *Salmonella* spp. é considerada o principal agente etiológico de surtos no país (BRASIL, 2014).

No que diz respeito à segurança microbiológica da carne de frango relacionada à *Salmonella* spp., deve-se ressaltar que no período de 2007 até 2016, foram notificados pela Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) 6.848 casos de surtos transmitidos por alimentos. Destes, 24,6% ocorreram na região sul do Brasil e apenas 1,4% foram relacionados à carne de aves *in natura*, processados e miúdos. Porém, aproximadamente 70% dos surtos são oriundos de fonte de alimentos não identificados. Caso semelhante ocorre em relação aos agentes etiológicos envolvidos, onde 70,3% deles não são identificados, e apenas 7,3% são *Salmonella* spp. (BRASIL, 2016).

2.3 *Salmonella* Heidelberg

A *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar Heidelberg pertence ao grupo de salmonelas paratíficas, podendo causar doença em animais ou em humanos, quando do consumo de carne crua ou ovos contaminados. Um dos fatores que mais contribuem para a alta incidência de salmonelas paratíficas é o alto grau de diversidade antigênica que o gênero possui, facilitando sua adaptação a diversos hospedeiros (BERNDT *et al.*, 2007). Além disso, *S. Heidelberg* é uma das cinco principais salmonelas associadas a toxinfecções em humanos e uma das mais comumente isoladas em galinhas, perus e suínos (FOLEY; LYNNE, 2008).

No Brasil, *S. Heidelberg* foi relatada pela primeira vez através de um estudo retrospectivo de 30 anos, entre 1962 e 1991, onde foi isolada de aves e produtos derivados provenientes de diversas regiões do país (HOFER *et al.*, 1997).

Em estudo realizado por Nascimento *et al.* (1996), foi observada a prevalência de *Salmonella* em carcaças e partes de frango. Dentre os sorovares mais isolados encontravam-se *S. Enteritidis* (51%), *S. Hadar* (26%) e *S. Heidelberg* (11%). Outro estudo, avaliando o processo higiênico sanitário de abate de frangos em três matadouros no Sul do Brasil, relatou que carcaças apresentaram positividade para *Salmonella*, sendo identificados os sorovares Heidelberg (63,9%), Enteritidis (31,9%), Worthington (2,1%) e Tennessee (2,1%) (DICKEL, 2004).

Borsoi *et al.* (2009) detectaram a presença de *S. Heidelberg* em 9% dos isolados de carcaças de frango comercializadas no Rio Grande do Sul. Kottwitz *et al.* (2010), identificaram *S. Heidelberg* como um dos sorovares envolvidos em surtos alimentares provenientes do consumo de produtos à base de ovos, carnes e derivados.

Em estudo realizado por Pulido-Landínez *et al.* (2013) avaliando a diversidade de *Salmonella enterica* na região sul do Brasil, foi isolado o sorovar Heidelberg em 46% das amostras, sendo o de maior predominância.

Nos últimos anos, perceberam-se alterações na predominância de sorovares associados a aves comerciais e infecções em humanos. Assim, *S. Heidelberg* e *S. Kentucky* surgiram como os sorovares predominantes em frangos de corte comerciais (CDC, 2008; FOLEY *et al.*, 2011). De acordo com Souza (2015), *S. Heidelberg* é atualmente o sorotipo mais prevalente em análises oficiais de controle realizadas no sul do Brasil. Somente no período de 2012 a 2014, a prevalência deste sorotipo foi de 20 a 33% do total de amostras positivas de *Salmonella* spp., fato este que justifica a escolha do assunto que trata este trabalho.

2.4 *Salmonella* na cadeia avícola

Como já citado anteriormente, a carne de aves e seus derivados são considerados um dos principais alimentos envolvidos em surtos de infecções alimentares por *Salmonella* spp. A contaminação das carcaças de frango pode acontecer pela presença do microrganismo no ambiente e instalações de criação das aves e, conseqüentemente, pela disseminação às carcaças durante as operações de abate no frigorífico, ainda que as boas práticas de higienização e processamento sejam adotadas. Geralmente, os surtos humanos ocorrem em decorrência do preparo inadequado e da contaminação cruzada em cozinhas domiciliares e industriais (COLLA, 2012a).

Estudos epidemiológicos apontam que as principais fontes de contaminação de lotes de aves de produção por *Salmonella* spp. são a aquisição de aves já contaminadas por matrizes infectadas, infecção cruzada no incubatório e contaminação ambiental nos galpões de criação. Desta forma, a prevenção e o controle deste patógeno envolvem práticas higiênico-sanitárias e monitoramento de fontes de contaminação, principalmente em granjas reprodutoras e incubatórios (SOUZA *et al.*, 2002).

A contaminação por *Salmonella* também é preocupação frequente nos frigoríficos avícolas do Brasil. Como consequência, no ano de 2003 o MAPA estabeleceu o “Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus”. O programa tem por objetivos verificar a prevalência de *Salmonella* spp. nos produtos avícolas, formar um banco de dados para análise dos índices de contaminação, estabelecer padrões quantitativos de aceitabilidade da contaminação, monitorar constantemente o nível de contaminação por este patógeno em estabelecimentos de abate de aves e aumentar as garantias de inocuidade dos produtos avícolas no mercado interno e externo (BRASIL, 2003b).

Entretanto, a forma mais efetiva para a prevenção e controle de *Salmonella* em aves e, conseqüentemente, em seus derivados consumidos pelo ser humano, continua sendo através da realização de um criterioso programa de biossegurança envolvendo todos os elos da cadeia avícola. Aditivos alimentares de natureza medicamentosa para o controle do patógeno incluem antimicrobianos de uso profilático e curativo (os quais a utilização como aditivos seja permitida), ácidos orgânicos, óleos essenciais, prebióticos, probióticos e simbióticos (VAN IMMERSEEL *et al.*, 2003).

2.5 Higienização nas instalações e indústria avícolas

O número cada vez mais crescente de surtos de infecção alimentar e os custos relacionados para o indivíduo para a indústria e para a economia de um país, colocam a segurança na produção dos alimentos como um ponto crítico a ser analisado (BAŞ, 2006; EGAN, 2007). O atual sistema de produção e o estilo de vida saudável do consumidor destacam a necessidade de práticas sanitárias eficientes, principalmente nas indústrias de processamento de alimentos (LANGSRUD *et al.*, 2003).

Na indústria avícola, os procedimentos de higienização realizados após o término do processo produtivo compreendem as etapas: 1) remoção de resíduos sólidos; 2) pré-enxague com água quente (45°C); 3) aplicação de detergente; 4) enxágue com água; 5) aplicação de sanitizantes e 6) enxágue com água. O processo é realizado em 12 ou 24 horas, ao final do turno de abate, e é definido como higiene pré-operacional. Entretanto, durante as operações, em tempos de 4 horas é realizada a higiene operacional, que consiste em um processo rápido de higienização nos intervalos na produção e que envolve etapas de remoção de resíduos sólidos e enxague (CONTRERAS *et al.*, 2003; ANDRADE, 2008).

Segundo a Portaria 210 de 1998 (BRASIL, 1999), para que os procedimentos de higienização garantam que as instalações e equipamentos, assim como seus produtos cárneos processados estejam de acordo com as condições higiênico-sanitárias exigidas, fica estabelecido que estabelecimentos que realizarem cortes e/ou desossa de aves devem garantir temperatura ambiente neste setor não superior a 15°C, onde a temperatura das carnes manipuladas não poderá exceder 7°C. Desta forma, justifica-se o uso, neste trabalho, da temperatura de contato do sanitizante a 12°C (sala de cortes) e, ainda a 25°C (temperatura ambiente).

Normalmente, ou em condições ideais, os equipamentos devem ser fabricados visando a prevenção do acúmulo de sujidades, permitindo uma maior qualidade do processo de limpeza e desinfecção, para que não ocorra a formação de biofilmes (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; FORSYTHE, 2013). É sabido que células em biofilme são muito mais resistentes à desinfecção do que quando comparadas às células planctônicas, tornando muitos métodos convencionais de desinfecção ineficientes contra biofilmes, sendo necessária a utilização de doses mais elevadas dos sanitizantes (PEREIRA, 2001; SIMÕES *et al.*, 2010; FORSYTHE, 2013). Portanto, a estratégia que se deve adotar para evitar a formação de biofilmes e a consequente contaminação de produtos alimentares é a prevenção através da limpeza e desinfecção de forma regular, não permitindo que

as células se fixem firmemente e entrem em contato com superfícies (MIDELET; CARPENTIER, 2004; SIMÕES *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2010). São comuns estudos que avaliem a concentração inibitória mínima (CIM) de agentes antimicrobianos, relacionando-a com a MIC necessária para impedir a adesão bacteriana e formação de biofilme ou até mesmo, a ação sobre microrganismos em biofilme já consolidado (PAGANO *et al.*, 2004).

Na avicultura atual, o uso dos sanitizantes tornou-se imprescindível, mesmo adotando-se medidas rigorosas de higiene. Devido à grande diversidade no sistema de produção avícola e as diferentes regiões geográficas onde estão instaladas, um plano único de limpeza e desinfecção seria inviável. Portanto, para que o processo seja efetivo deve-se estabelecer um programa com objetivos claros, tais como susceptibilidade do agente patogênico, populações mistas de microrganismos, tipo de superfície e construção, condições ambientais (umidade e temperatura), quantidade de matéria orgânica e presença de recursos e equipamentos (MORGULIS, 2005; KUANA, 2009).

2.6 Sanitizantes

Os antissépticos e sanitizantes são usados extensivamente na produção animal, sendo uma parte essencial das práticas de controle de infecção e auxiliando na prevenção de doenças clínicas e subclínicas (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Por definição, um sanitizante é um composto capaz de reduzir as contagens microbianas a níveis seguros de saúde pública e minimizar as chances de transmissão da doença entre um organismo e outro (BRASIL, 1993; TORTORA *et al.*, 2012).

O sanitizante é uma substância normalmente química, que inativa as formas vegetativas, mas não necessariamente as formas esporuladas de microrganismos patogênicos (PELCZAR, 1990). Como características básicas, um bom sanitizante deve possuir alta eficácia germicida, apresentar estabilidade química, ser inodoro ou com odor agradável, incolor, não produzir manchas, apresentar alta capacidade de penetração nas camadas de matéria orgânica sem perder sua ação, além de não possuir ação corrosiva (ALTERTHUM, 2015).

Na indústria de alimentos, a desinfecção correta das superfícies de contato é uma importante barreira sanitária para evitar a contaminação por microrganismos deteriorantes ou potencialmente patogênicos (MOLINA, 2010). A sanitização tem como objetivo a redução do número destes microrganismos presentes nas superfícies onde o alimento terá

contato, de forma a tornar o produto mais seguro e propiciar um tempo maior de prateleira. Esse processo pode ser falho quando parâmetros importantes são desconsiderados, como uma limpeza eficiente anterior a aplicação do produto, concentração do sanitizante, temperatura e tempo de exposição. Quando esses fatores são rotineiramente ignorados, a baixa concentração do sanitizante em contato com o patógeno pode levar a seleção de microrganismos resistentes (LANGSRUD *et al.*, 2003). Inúmeros compostos químicos ativos estão disponíveis no mercado, sendo os mais utilizados na avicultura os compostos de amônia quaternária, glutaraldeído e hipoclorito de sódio (JAENISCH *et al.*, 2004; GREZZI, 2007).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o MAPA, são os órgãos responsáveis pela regulamentação do uso de saneantes. Antes da comercialização, os dois órgãos atuam no registro e notificação desses produtos, observando critérios de qualidade para garantir a eficácia e segurança dos produtos. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 14 de 2007 aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com ação antimicrobiana destinados ao uso em objetos, superfícies inanimadas e ambientes (domiciliar, industrial, hospitalar e outros estabelecimentos públicos e privados de atendimento à saúde) (BRASIL, 2007). Além disso, a Instrução Normativa (IN) n° 26/2009 do MAPA regulamenta a fabricação, controle de qualidade e comercialização de produtos antimicrobianos de uso veterinário (BRASIL, 2009).

2.6.1 Hipoclorito de Sódio

Os sanitizantes clorados, do grupo dos halogênios, são amplamente utilizados na atividade avícola pois têm poder residual pobre e são germicidas, tendo ação fungicida, algicida e protozoocida, viricida e contra formas vegetativas de bactérias, porém pouco efetivos contra esporos bacterianos. Tem sua atividade aumentada na presença de água quente (PAULINO, 2006) e ação bactericida assegurada em faixas de pH neutro e ácido (pH de 5 a 7) (KUANA, 2009).

A solução de hipoclorito de sódio (NaClO), com 10 a 12% de cloro ativo, é um dos principais compostos clorados inorgânicos utilizados para desinfecção no Brasil (ANDRADE, 2008; MACEDO; OLIVEIRA, 2010). A quantidade de cloro livre que estará presente na solução dependerá do pH. Em pH igual a 8,0, cerca de 22% do cloro estará na forma ativa, enquanto que, em pH igual a 6,0, haverá cerca de 96% do cloro na forma ativa (SOUZA; DANIEL, 2005). A adição de cloro, hipoclorito de sódio e outros

compostos clorados na água formam o ácido hipocloroso (HOCl), considerado a forma mais efetiva do cloro, pois tem carga neutra e se difunde tão rapidamente quanto a água através da célula (ANDRADE, 2008; VERMELHO *et al.*, 2011). O ácido hipocloroso age através da inibição de certos sistemas enzimáticos vitais para o metabolismo bacteriano, fazendo a oxidação dos grupos sulfídricos dos aminoácidos sulfurados presentes nas enzimas bacterianas. Isso explica o fato de que os teores residuais de cloro na água de bebida são suficientes para eliminar formas vegetativas bacterianas (PAULINO, 2006; ANDRADE, 2008).

O hipoclorito de sódio possui inúmeras vantagens em relação à outros sanitizantes químicos: custo baixo, de fácil preparação e aplicação, ação rápida, não afetados pela dureza da água, efetivos contra grande variedade de microrganismos e em baixas concentrações, relativamente não-tóxicos, sendo que os equipamentos não necessitam de enxague após a sanitização. Apesar de todas as vantagens, o sanitizante também apresenta algumas desvantagens: instabilidade ao armazenamento, inativação pela matéria orgânica, corrosão, irritação da pele, baixa eficiência em pH mais elevado e oxidação da borracha, que muitas vezes é componente de equipamentos (ANDRADE, 2008).

Dentro da indústria de alimentos, o hipoclorito de sódio pode ser utilizado desde a sanitização de superfícies de paredes, pisos, tetos, equipamentos e utensílios, até para a redução do número de microrganismos em carcaças (bovinas, suínas e de aves), frutas, vegetais e água de resfriamento de alimentos enlatados esterilizados (ANDRADE, 2008).

2.6.2 Amônia quaternária

Os compostos de amônia quaternária, do grupo dos detergentes catiônicos e onde se inclui o cloreto de benzalcônio, também são sanitizantes muito utilizados na avicultura, porém têm atuação limitada na presença de matéria orgânica e em superfícies com restos de sabões e detergentes aniônicos (CONY; ZOCHE, 2004). Atuam em uma ampla faixa de pH e são considerados muito eficientes sobre bactérias Gram-positivas e microrganismos termofílicos. No entanto, apresentam baixa ação sobre bactérias Gram-negativas, além de ser pouco eficientes contra coliformes e psicrofílicos e ineficientes contra esporos. Ainda, são incompatíveis com agentes tensoativos aniônicos, não corrosivos e nem tóxicos. Normalmente, são utilizados para a sanitização de pisos, paredes e equipamentos e no controle microbiológico do ar de ambientes de processamento (ANDRADE, 2008).

O mecanismo de ação desse grupo se dá através da desnaturação e precipitação

das proteínas da membrana celular e do citoplasma bacteriano, liberando nitrogênio e potássio das células. Também agem quebrando os complexos lipoprotéicos da célula bacteriana liberando enzimas autolíticas. Geralmente, os compostos de amônia quaternária combinam-se com proteínas, gorduras e alguns fosfatos e têm alto poder de adsorção na parede celular, onde exercem sua ação antibacteriana (PAULINO, 2006).

2.7 Resistência aos sanitizantes

A resistência bacteriana aos sanitizantes pode ser uma característica intrínseca ao microrganismo ou pode ser adquirida (MCDONNELL; RUSSELL, 1999; BOROWSKY *et al.*, 2006). A resistência intrínseca pode ser uma característica própria, como por exemplo a composição da membrana e parede, a expressão de bombas de efluxo e a produção de enzimas de neutralização; e geralmente apresentada por bactérias Gram-negativas, esporuladas, micobactérias e por vezes estafilococos (BOROWSKY *et al.*, 2006). Por outro lado, a resistência adquirida pode surgir por mutação celular ou pela aquisição de elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons e/ou integrons) (RUSSELL, 1998; BRAGG *et al.*, 2014).

Assim como acontece com os antibióticos, concentrações residuais de sanitizantes podem levar à sobrevivência de microrganismos tolerantes ou ainda à seleção de bactérias tolerantes a biocidas (AASE *et al.*, 2000; RUSSELL, 2002a). Porém, até pouco tempo atrás, a resistência aos sanitizantes não era considerada tão importante quanto a resistência aos antimicrobianos. Só mais recentemente é que estudos indicaram a ligação com a resistência e a resistência cruzada com antimicrobianos (RUSSELL, 2002b; RUSSELL, 2004; HUET *et al.*, 2008; MAILLARD; MCDONNELL, 2012).

Colla *et al.* (2012b) estudaram o perfil de resistência à clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético em isolados de *S. Heidelberg* de abatedouros. Os resultados encontrados indicaram que amostras isoladas no ano de 2005 apresentavam 100% de sensibilidade a amônia quaternária, enquanto que amostras do ano de 2009 apresentaram 33% de resistência ao mesmo sanitizante, ocorrendo uma progressão na resistência às substâncias.

Considerando a constante expansão da atividade avícola no Brasil, os programas sanitários das granjas e indústrias devem acompanhar tal desenvolvimento a fim de se evitar a disseminação de patógenos e principalmente a resistência de microrganismos.

Uma alternativa ao uso contínuo do sanitizante de escolha do programa de biossegurança, seria a adoção de um sistema de rodízio de sanitizantes de diferentes princípios ativos e mecanismos de ação com o objetivo de protelar a seleção de microrganismos resistentes, assim como aumentar o período de eficácia destes (SCUR *et al.*, 2016).

2.8 Antimicrobianos

Há várias décadas, os antimicrobianos têm sido utilizados na produção animal, tanto com objetivo preventivo quanto terapêutico. Além disso, os antimicrobianos, podem ser utilizados como promotores de crescimento, a fim de melhorar o desempenho de crescimento das aves e, assim, aumentar a produtividade (ROSTAGNO, 2010; MELO, 2014). Os antimicrobianos mais utilizados ao longo do tempo para este propósito foram as tetraciclina, os macrolídeos e as penicilinas. Porém, desde 1975, a União Européia banuiu o uso de tetraciclina e β -lactâmicos como promotores de crescimento (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). Hoje, no Brasil, são autorizadas como promotores de crescimento apenas as seguintes substâncias: avilamicina, bacitracina, bacitracina de zinco, colistina, clorexidina, enramicina, flavomicina, halquinol, lasalocida, lincomicina, monensina, narasina, ractopamina, salinomicina, tiamulina, tilosina, virginiamicina e zilpaterol (BRASIL, 2015).

Uma consequência indesejável do uso de antimicrobianos como melhoradores de desempenho é o potencial desenvolvimento de resistência em patógenos de origem alimentar e subsequente transmissão ao homem, através dos alimentos (RIBEIRO *et al.*, 2008; MELO, 2014). Essa preocupação fez com que a Comunidade Europeia banisse a utilização não terapêutica de antimicrobianos, excluindo o uso de agentes promotores de crescimento na produção animal, fazendo com que países como o Brasil e Estados Unidos reduzissem drasticamente a utilização destas drogas (SANTANA *et al.*, 2011). No entanto, segundo um relatório do *The Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme* (DANMAP), o uso de drogas antimicrobianas na produção avícola aumentou em 184% em 2015, devido aos vários surtos de graves doenças que acometeram os plantéis (DANMAP, 2015).

Inúmeras organizações internacionais como *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), *World Health Organization* (WHO), *World Organization for Animal Health* (OIE) e *Codex Alimentarius* vêm discutindo, há alguns anos, o impacto à saúde pública resultante do uso de agentes antimicrobianos em animais de produção.

Desta forma, com o objetivo de minimizar e conter a resistência antimicrobiana, foi aprovado pela comissão do *Codex Alimentarius* um código internacional dispendo de diretrizes sobre o uso responsável e prudente dessas substâncias, bem como recomendações aos governos, encorajando-os a implantar seus próprios programas de monitoramento e vigilância perante a relevância do problema (BRASIL, 2012a).

A preocupação global e a implementação de sistemas de vigilância e monitoramento da resistência microbiana levaram à criação de diversos testes laboratoriais que tem por objetivo verificar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* de diversas espécies bacterianas. Todos os testes se limitam a dois procedimentos básicos: gradiente de concentração (difusão ou disco) e diluição (ágar ou caldo). A decisão sobre a utilização de um dos métodos é baseada no custo, facilidade de uso e na flexibilidade (GUIGUÈRE, 2010). Entretanto, para qualquer que seja a escolha, deve-se levar em conta que os testes devem ser realizados seguindo os métodos aceitos mundialmente e definidos por algum órgão competente, como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) (SCHWARZ *et al.*, 2010) e mais recentemente o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) (MARTINO, 2015).

Normalmente, os resultados para testes de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* são apresentados através de forma quantitativa ou qualitativa (GUIGUÈRE, 2010). O resultado qualitativo é relatado apenas como sensível (isolado inibido/sucesso terapêutico), intermediário (efeito terapêutico indeterminado ou incerto) ou resistente (isolado não-inibido/risco elevado de insucesso na terapêutica). Já o resultado quantitativo, além de fazer a mesma classificação, é também expresso como MIC, em $\mu\text{g/mL}$ ou mg/L (KAHLMETER *et al.*, 2003; GUIGUÈRE, 2010).

Existem dois critérios interpretativos para avaliar um teste de MIC, como o realizado neste trabalho: valores de *breakpoint* clínicos e valores de *cut-off* epidemiológicos (ECOFFs) (KAHLMETER *et al.*, 2003; BYWATER *et al.*, 2006; SCHWARZ *et al.*, 2010). Os *breakpoints* podem servir como guia para a terapêutica, classificando o isolado em clinicamente sensível, intermediário ou resistente ao antimicrobiano testado (SILLEY, 2012), enquanto que os valores de ECOFF são utilizados em estudos para detectar mecanismos de resistência e inspecionar o desenvolvimento da resistência em populações microbianas definidas (KAHLMETER *et al.*, 2003; EFSA, 2012).

Os valores de ECOFF são formulados pelo EUCAST a partir da distribuição dos valores de MIC em populações de microrganismos sem mecanismo de resistência adquirida fenotipicamente detectável, as chamadas populações-selvagens ou *wild type* (WT). Por outro lado, existem também as populações que possuem um mecanismo de resistência detectável fenotipicamente e são conhecidas como não-selvagens ou *non-wild type* (nWT) (KAHLMETER *et al.*, 2003; SILLEY, 2012; EFSA, 2015). Para definir os ECOFFs, é necessária a coleta e análise de dados do microrganismo em questão e sua relação com o antimicrobiano. Em seguida, os dados são adicionados a um banco de dados disponibilizado gratuitamente na internet (<http://mic.eucast.org/Eucast2/>).

2.9 Resistência aos antimicrobianos

Ainda que grande parte das infecções por *Salmonella* sejam auto limitantes em seres humanos e resolvam-se dentro de alguns dias, as toxinfecções por *S. Heidelberg* tendem a causar uma porcentagem desproporcionalmente alta de infecções invasivas, tornando a terapia antimicrobiana justificável e fazendo da resistência aos antimicrobianos uma preocupação. Muitos dos sorovares de *S. Heidelberg* resistentes têm sido isolados tanto de seres humanos quanto de carnes e rações para animais (HAN *et al.*, 2010). Portanto, a utilização indiscriminada de substâncias antimicrobianas tanto para o tratamento de doenças na medicina humana quanto na veterinária, além do uso para a melhoria dos índices zootécnicos dos animais de produção deve ser repensada pois contribui largamente para o surgimento de bactérias multirresistentes (HUR *et al.*, 2012).

O modo de ação de cada antimicrobiano deve ser conhecido para que se torne possível compreender os mecanismos envolvidos na resistência antimicrobiana (FIGURA 1). De forma resumida, são cinco os modos de ação: (1) inibição da síntese de ácidos nucleicos – quinolonas; (2) inibição da síntese de metabólitos essenciais – sulfonamidas; (3) danos à membrana plasmática – polimixina B; (4) inibição da síntese proteica – tetraciclina, aminoglicosídeos e cloranfenicol; e (5) inibição da síntese da parede celular – penicilinas e cefalosporinas (TORTORA *et al.*, 2012).

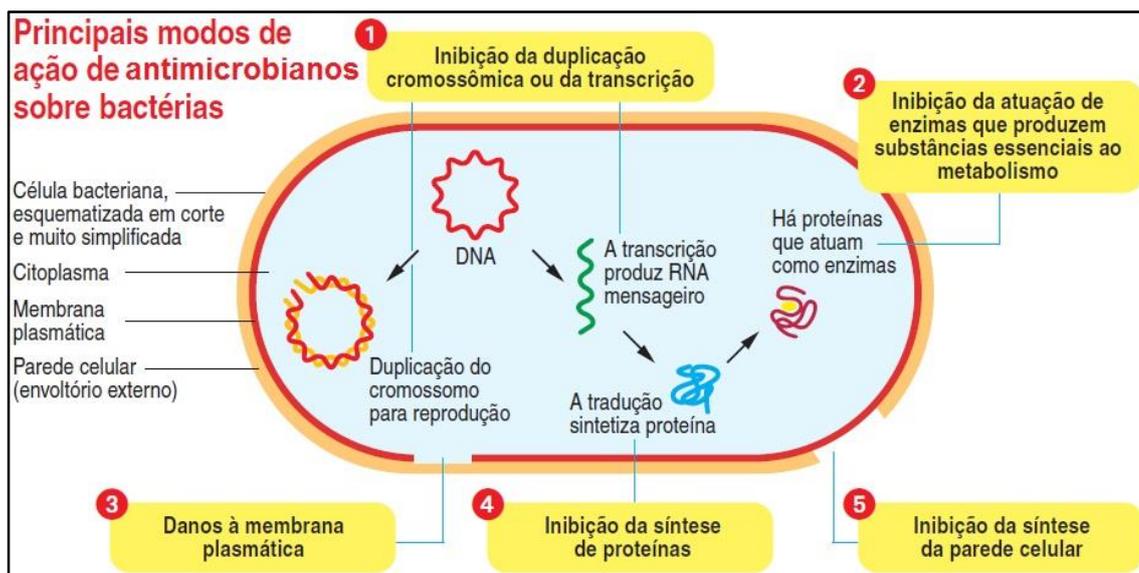


FIGURA 1 – Principais modos de ação de antimicrobianos sobre bactérias. (Fonte: Adaptado de CANTO, 2009).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode exibir dois fenótipos: resistência intrínseca e resistência adquirida. A resistência intrínseca é natural a todos os membros de um grupo taxonômico e resulta de características estruturais ou bioquímicas inerentes aos microrganismos selvagens (GIGUÈRE, 2010), independentemente da exposição anterior ao agente antimicrobiano e não podendo ser transferida horizontalmente (FAJARDO *et al.*, 2008). Exemplos de mecanismo intrínseco são as bombas de efluxo na *Pseudomonas aeruginosa*, que expulsam diversas classes de antimicrobianos que conseguem adentrar a célula bacteriana (LI *et al.*, 1994; KÖHLER *et al.*, 1997); e ainda, a membrana externa de bactérias Gram-negativas que funciona como uma barreira para compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (ALEKSHUN; LEVY, 2007).

Por outro lado, a resistência adquirida pode ser em decorrência da mutação de genes envolvidos nos mecanismos fisiológicos e de estruturas celulares normais, da aquisição de genes de resistência estranhos ou da combinação destes (GIGUÈRE, 2010). As mutações que causam as diferenças genéticas podem se espalhar horizontalmente entre as bactérias por processos conhecidos como conjugação, transformação e transdução. Devido à alta taxa de reprodução das bactérias, apenas um curto espaço de tempo é necessário para que quase toda a população torne-se resistente ao antimicrobiano (TORTORA *et al.*, 2012).

As alterações genéticas podem ser causadas por mutações cromossômicas ou pela aquisição de plasmídeos de resistência, transposons ou integrons (FRYE; JACKSON, 2013; ALTERTHUM, 2015). A resistência mediada por mutações geralmente é simples,

atingindo apenas uma substância antimicrobiana, já que dificilmente uma célula bacteriana sofre mutação simultânea para mais de um antimicrobiano (ALTERTHUM, 2015).

Os plasmídeos são elementos móveis capazes de coexistirem, na mesma célula, com outros elementos móveis e, por isso, sua resistência pode ser múltipla, ou seja, genes de resistência para diferentes antimicrobianos podem estar envolvidos, levando ao aparecimento de isolados com resistência múltipla. Considerados elementos extracromossomais de replicação autônoma, os plasmídeos transportam genes que não são necessários para o crescimento e multiplicação celular, mas que podem codificar fenótipos fundamentais à sobrevivência em condições adversas, como resistência aos antimicrobianos e fatores de patogenicidade (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001).

Os transposons são segmentos de DNA também capazes de carrear genes de resistência. Porém, ao contrário dos plasmídeos, não possuem sistemas de replicação e precisam estar integrados no DNA cromossomal destes (SCHWARZ; CHASLUS-DANCLA, 2001). São capazes de se mover de um ponto a outro de um cromossomo, mudar de cromossomo e também mover-se do genoma de uma espécie para o de outra (LORETO; FERREIRA, 2012).

Os integrons de classe 1 são elementos genéticos inseridos em plasmídeos e transposons, que possuem em cada uma de suas extremidades sequências conservadas (CS) (FIGURA 2). A extremidade 5', ou 5'-CS, é composta por três partes: um gene *intI1*, que codifica uma integrase de classe 1, responsável pela integração e excisão de genes cassetes; um sítio de recombinação *attI1*, onde os genes cassetes são preferencialmente integrados; e um promotor, que regula a expressão dos genes cassetes que estão localizados entre as duas CS. A extremidade 3' (3'-CS) é geralmente composta de um gene *qacEAI* conjugado a um gene *sulI*. Estes genes codificam resistência para compostos de amônia quaternária e sulfonamidas, respectivamente. Portanto, os integrons de classe 1 são capazes de inserir e excluir genes cassetes, os quais em sua grande maioria conferem resistência bacteriana a diferentes classes de antimicrobianos, demonstrando assim como pode existir a resistência cruzada entre sanitizantes e antimicrobianos (PAULSEN *et al.*, 1993; HALL *et al.*, 1994; GAZE *et al.*, 2005; CHUANHUEN *et al.*, 2008a). Muitos dos genes de resistência aos antimicrobianos encontrados em bactérias Gram-negativas estão contidos em cassetes de genes, vários dos quais integrados numa posição específica de um integron (PADILLA; COSTA, 2015).

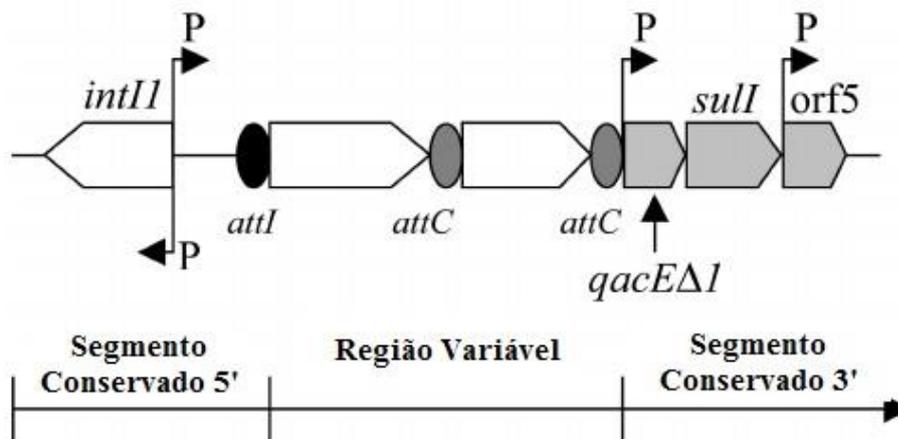


FIGURA 2 – Estrutura geral de um integron classe 1. Genes: *intI1*, integrase; *qacEΔ1*, resistência aos compostos de amônia quaternária; *sulI*: resistência às sulfonamidas; *orf5*: função desconhecida. (Fonte: Adaptado de DROUIN *et al.*, 2002).

A múltipla resistência aos antimicrobianos é um problema de saúde pública observado a nível mundial. A presença de bactérias multirresistentes se deve à presença de genes de resistência, para diferentes antimicrobianos, em um só plasmídeo ou, ainda, amostras com resistência múltipla diante da presença de dois ou mais plasmídeos diferentes em uma mesma bactéria (ALTERTHUM, 2015). Essa capacidade de adaptação dos microrganismos para escapar da ação de fármacos antimicrobianos tem levado à inúmeras tentativas de elucidar a possível existência de mecanismos de resistência compartilhados entre os antimicrobianos e sanitizantes (CABRERA *et al.*, 2007).

Estando a resistência antibacteriana amplamente difundida, algumas medidas de controle em determinado país podem ser ineficazes devido à importação de produtos alimentícios contaminados com bactérias resistentes, por exemplo, ou presentes na microbiota normal de animais ou humanos de países com controle menos rigoroso. Portanto, para evitar o aparecimento de isolados bacterianos resistentes aos antimicrobianos é necessária a realização correta de testes de sensibilidade seguida de prescrição de medicamentos aos quais as cepas apresentam maior sensibilidade (QUINN *et al.*, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Local de estudo

Os experimentos foram realizados junto ao Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Todos os equipamentos necessários para o estudo pertencem ao laboratório da universidade.

3.2 Isolados de *S. Heidelberg*

Os isolados de *S. Heidelberg* analisados são de fontes avícolas, procedentes da região sul do Brasil e seus dados encontram-se disponíveis no Apêndice A. Dentre os 40 isolados pesquisados, 20 foram coletados, isolados e sorotipificados no ano de 2006 (BORSOI, 2009). Os demais (20) foram isolados e sorotipificados no ano de 2016 por um laboratório de diagnóstico veterinário particular credenciado ao MAPA e gentilmente cedidas para este experimento.

Todos os isolados encontravam-se armazenados em *eppendorfs* contendo caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI - Oxoid®) com glicerol (3:1) e mantidos sob a temperatura de -80°C. Para a reativação dos mesmos, foi utilizado primeiramente ágar *Xylose Lysine Deoxycholate* (XLD - Merck®). As placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ e após 24 horas, foi observada a presença de colônias compatíveis com *Salmonella* spp. Assim, uma colônia característica foi selecionada e semeada em caldo BHI sob as mesmas condições de incubação anteriormente descritas.

3.3 Avaliação da eficácia dos sanitizantes

O método para avaliação da eficiência dos sanitizantes foi o de diluição, com teste de suspensão em células planctônicas, conforme descrito pelo MAPA - Portaria nº 101 (BRASIL, 1993).

3.3.1 Sanitizantes e o preparo das diluições

Avaliou-se a susceptibilidade dos isolados de *S. Heidelberg* em suspensão frente a dois sanitizantes de uso comercial: hipoclorito de sódio (MediQuímica®) e cloreto de

benzalcônio (Êxodo Científica®). As concentrações de teste fazem referência àquelas indicadas em produtos comerciais e rotineiramente utilizadas nas instalações e indústrias avícolas. Para o hipoclorito de sódio foram testadas concentrações de 0,5% e 1,0%, enquanto que para o cloreto de benzalcônio as concentrações foram de 100 ppm e 200 ppm.

Os sanitizantes foram diluídos em água destilada estéril. A seguir, foram distribuídos, em tubos de ensaio, 9 mL de cada concentração a ser testada. A adição de 1% de Soro Fetal Bovino (Gibco®), indicando a presença de matéria orgânica, foi realizada imediatamente antes do início do ensaio.

3.3.2 Determinação da suspensão teste

Após a reativação dos isolados de *S. Heidelberg*, uma alíquota do caldo BHI inoculado foi retirada e adicionada a um tubo contendo Água Peptonada Tamponada (APT - Himedia®) 0,1%, a fim de obter turbidez compatível com escala 0,5 de *MacFarland* (aproximadamente 10^8 UFC/mL). Para confirmação da concentração bacteriana desejada, foi determinada a densidade óptica (DO) por espectrofotômetro (SP 22, Biospectro, Brasil) no comprimento de onda 625 nm. Após, 1 mL da suspensão foi diluído em 9 mL de APT 0,1%, por duas vezes, gerando ao final um inóculo com aproximadamente 10^6 UFC/mL.

3.3.3 Teste da atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio

Todos os tubos de ensaio contendo as diluições dos sanitizantes com a matéria orgânica foram submetidos a diferentes condições de temperatura ($12 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$). A cada tubo foram adicionados 100 μL do inóculo e imediatamente o tempo de contato foi cronometrado. Após 5 e 15 minutos de exposição, alíquotas de 10 μL das suspensões foram retiradas e transferidas em triplicata para tubos contendo caldo BHI acrescidos de solução neutralizante (polissorbato 80, lecitina de soja e tiosulfato de sódio), para que o efeito do sanitizante fosse inibido. Os tubos foram incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 96 horas. Aqueles com turvação, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo foram considerados positivos (crescimento bacteriano) e confirmados através do repique de uma alíquota em placas contendo ágar seletivo XLD, a fim de confirmar a viabilidade bacteriana e excluir a possibilidade de presença de microrganismos contaminantes. As

placas foram incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Ao final, os isolados testados foram classificados como resistentes ou sensíveis perante a ação dos sanitizantes.

3.4 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de antimicrobianos

Os testes de concentração inibitória mínima (MIC) foram realizados como determinado pelo CLSI (2013a; 2013b), através do método de microdiluição em caldo.

3.4.1 Antimicrobianos e o preparo das soluções-estoque

Os antimicrobianos testados pertencem a quatro classes distintas: aminoglicosídeos (gentamicina (Sigma-Aldrich®)), fencóis (cloranfenicol (Sigma-Aldrich®)), quinolonas (ácido nalidíxico (Sigma-Aldrich®), ciprofloxacina (Sigma-Aldrich®) e enrofloxacina (Sigma-Aldrich®)) e tetraciclina (tetraciclina (Sigma-Aldrich®)). As concentrações adotadas para o ensaio, bem como os valores de ECOFF utilizados para a interpretação dos resultados são recomendações do EUCAST (EFSA, 2012). Os valores de *breakpoint* são critérios adotados pelo CLSI (2013b). Na ausência dos parâmetros interpretativos para enrofloxacina no EUCAST e CLSI, os valores de ECOFF e *breakpoint* foram os indicados em estudo prévio (HAO *et al.*, 2013) (TABELA 1).

TABELA 1 – Antimicrobianos testados, intervalo das concentrações e valores de ECOFF e de *breakpoint*.

Antimicrobianos	Concentrações ($\mu\text{g/mL}$)	ECOFF ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Breakpoint</i> ($\mu\text{g/mL}$)
Ácido nalidíxico	1 - 128	$> 16^a$	$\geq 32^b$
Ciprofloxacina	0,008 - 16	$> 0,064^a$	$\geq 4^b$
Cloranfenicol	2 - 128	$> 16^a$	$\geq 32^b$
Enrofloxacina	0,008 - 8	$> 2^c$	$\geq 0,5^c$
Gentamicina	0,25 - 64	$> 2^a$	$\geq 16^b$
Tetraciclina	0,5 - 64	$> 8^a$	$\geq 16^b$

^a Fonte: <https://mic.eucast.org/Eucast2/>

^b CLSI, 2013b

^c HAO *et al.*, 2013

O preparo das soluções-estoque dos antimicrobianos testados seguiu o recomendado pelo CLSI (CLSI, 2013a). Desta forma, as concentrações foram equivalentes a dez vezes a maior concentração a ser testada ou apresentavam, no mínimo, 1.000 $\mu\text{g/mL}$.

Após a diluição dos antimicrobianos, os mesmos foram aliquotados em *ependorfs*, protegidos da luz e estocados a -20°C até o momento do uso.

3.4.2 Determinação da suspensão teste

Após a reativação dos isolados de *S. Heidelberg* em caldo BHI, uma alçada foi inoculada em placa contendo *Trypticase Soy Agar* (TSA - Oxoid®) e então incubada a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 horas. A seguir, algumas colônias foram colocadas em solução salina 0,85% (NaCl - Synth®) a fim de obter turbidez compatível com escala 0,5 de *MacFarland* – correspondente a 1×10^8 UFC/mL. Para confirmação da concentração bacteriana desejada, foi determinada a densidade óptica (DO) por espectrofotômetro (SP 22, Biospectro, Brasil) no comprimento de onda 625 nm.

Por fim, a suspensão foi diluída em 9 mL de caldo *Cation Adjusted Muller Hinton* (CAMBH - Fluka®), correspondendo a uma concentração de 10^7 UFC/mL.

3.4.3 Teste da concentração inibitória mínima

Diluições seriadas de base 2 das soluções estoque de antimicrobianos com CAMBH foram realizadas e, a cada poço de uma placa de microdiluição de 96 poços (Kasvi®), foram adicionados 100 μL em ordem decrescente de concentração. Após, os poços receberam 5 μL da suspensão teste, resultando em uma concentração final de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL ou 5×10^4 UFC/poço.

Para cada fileira da microplaca contendo o isolado testado nas diferentes concentrações do antimicrobiano, também havia um poço contendo apenas CAMBH sem antimicrobiano (controle negativo) e um poço contendo CAMBH sem antimicrobiano e com inóculo (controle positivo), para que fosse comprovado o crescimento bacteriano. Além disso, uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade em todas as placas de teste e, periodicamente, era realizada a contagem em placa para avaliar a correta diluição dos microrganismos. Para tanto, uma alíquota de 10 μL do poço controle positivo era inoculada em 10 mL de solução salina. Desta, 100 μL foram espalhados pela técnica de *spread plate* em ágar TSA e incubado a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18-24 horas. A contagem esperada era de 20 a 80 colônias, correspondendo a 2 a 8×10^5 UFC/mL (concentração final do inóculo na placa de microdiluição).

As placas de microdiluição foram seladas com parafilme e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16-20 horas. Após análise sob um fundo escuro, a concentração inibitória mínima do antimicrobiano para o isolado testado foi estabelecida pela menor concentração onde não foi observado crescimento bacteriano.

3.5 Análise estatística

A análise estatística descritiva foi usada para determinar o agrupamento dos isolados conforme o perfil de susceptibilidade, tanto para os testes de avaliação da eficácia dos sanitizantes quanto para os testes de concentração inibitória mínima dos antimicrobianos. O teste não-paramétrico de *McNemar* foi utilizado para avaliar a comparação entre os períodos (2006 e 2016) para os isolados correlacionados. O programa *PASW Statistics 18* foi utilizado para as análises, adotando-se como referência o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da eficácia dos sanitizantes

Dentre os 20 isolados de *S. Heidelberg* de 2006, todos apresentaram-se sensíveis às duas concentrações de hipoclorito de sódio a $12 \pm 1^\circ\text{C}$ e apenas 2 (10%) isolados foram resistentes a temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, concentração 0,5% e tempo de contato de 5 minutos. Todos os isolados do ano de 2016 demonstraram sensibilidade ao sanitizante hipoclorito de sódio, independente de temperatura, concentração de uso ou tempo de contato (TABELA 2).

TABELA 2 – Número de isolados de *S. Heidelberg* resistentes ao hipoclorito de sódio por concentração, temperatura e tempo de contato.

Condições (Conc. + T)	Tempo de contato	Nº de isolados resistentes (%)	Nº de isolados resistentes (%)
		Ano 2006	Ano 2016
0,5% e $12 \pm 1^\circ\text{C}$	5'	0	0
	15'	0	0
1,0% e $12 \pm 1^\circ\text{C}$	5'	0	0
	15'	0	0
0,5% e $25 \pm 1^\circ\text{C}$	5'	2 (10%)	0
	15'	0	0
1,0% e $25 \pm 1^\circ\text{C}$	5'	0	0
	15'	0	0

Legenda: Conc.: concentração testada do sanitizante, T: temperatura de uso do sanitizante durante os ensaios.

Nos 20 isolados de 2006 testados frente ao sanitizante cloreto de benzalcônio, a uma concentração de 100 ppm e $12 \pm 1^\circ\text{C}$, 14 (70%) e 8 (40%) foram resistentes nos tempos de contato de 5 e 15 minutos, respectivamente. Quando utilizada a mesma temperatura, porém com concentração de 200 ppm, os isolados resistentes foram 5 (25%) e 1 (5%), para 5 e 15 minutos de contato (TABELA 3). Quando a temperatura adotada foi de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, a uma concentração do sanitizante de 100 ppm, 14 (70%) e 6 (30%) isolados demonstraram resistência aos 5 e 15 minutos de contato, enquanto que para as mesmas condições, somente com concentração alterada para 200 ppm, a resistência foi observada em apenas 4 (20%) e 2 (10%) isolados, aos 5 e 15 minutos, respectivamente (TABELA 4).

Os isolados de 2006 ainda apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no perfil de susceptibilidade ao cloreto de benzalcônio considerando-se a concentração de uso, independentemente do tempo de contato e da temperatura. Assim, houve uma maior frequência de isolados sensíveis à concentração de 200 ppm. A exceção foi o teste com o sanitizante a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 minutos, onde não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as concentrações de 100 e 200 ppm.

TABELA 3 – Número de isolados de *S. Heidelberg* resistentes ao cloreto de benzalcônio a $12 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tempo de contato	Nº de isolados resistentes (%)		Nº de isolados resistentes (%)	
	Ano 2006		Ano 2016	
	100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm
5'	14 (70%) a	5 (25%) a	17 (85%) a	7 (35%) a
15'	8 (40%) b	1 (5%) a	7 (35%) b	1 (5%) b

Legenda: o número de isolados resistentes seguido por letras minúsculas diferentes nas colunas, diferem entre si pelo teste de McNemar ($p < 0,05$).

TABELA 4 – Número de isolados de *S. Heidelberg* resistentes ao cloreto de benzalcônio a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

Tempo de contato	Nº de isolados resistentes (%)		Nº de isolados resistentes (%)	
	Ano 2006		Ano 2016	
	100 ppm	200 ppm	100 ppm	200 ppm
5'	14 (70%) a	4 (20%) a	15 (75%) a	11 (55%) a
15'	6 (30%) b	2 (10%) a	5 (25%) b	1 (5%) b

Legenda: o número de isolados resistentes seguido por letras minúsculas diferentes nas colunas, diferem entre si pelo teste de McNemar ($p < 0,05$).

O número de isolados resistentes do ano de 2016 testados frente ao cloreto de benzalcônio a uma concentração de 100 ppm e $12 \pm 1^\circ\text{C}$ foi de 17 (85%) e 7 (35%), nos tempos de contato de 5 e 15 minutos, respectivamente. Quando utilizada a mesma temperatura, porém com concentração de 200 ppm, os isolados resistentes foram 7 (35%) e 1 (5%), para 5 e 15 minutos de contato (TABELA 3). Quando a temperatura adotada foi de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, a uma concentração de cloreto de benzalcônio de 100 ppm, 15 (75%) e 5 (25%) isolados demonstraram resistência aos 5 e 15 minutos de contato, enquanto que para as mesmas condições, somente com concentração alterada para 200 ppm, a resistência foi observada em 11 (55%) e 1 (5%) isolados, aos 5 e 15 minutos, respectivamente (TABELA 4).

Os isolados de 2016 também apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no perfil de susceptibilidade ao cloreto de benzalcônio considerando-se a concentração de uso, independentemente do tempo de contato e a $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Neste caso, houve uma maior frequência de isolados sensíveis com a concentração de 200 ppm. No entanto, não houve diferença ($p > 0,05$) no perfil conforme a concentração quando se avaliou o sanitizante a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e nos dois tempos de contato.

Quando comparados os dois períodos de tempo estudados, 2006 e 2016, houve diferença significativa ($p < 0,05$) apenas quando se avaliou o sanitizante cloreto de benzalcônio na concentração de 200 ppm a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e por um tempo de contato de 5 minutos. Neste caso, a frequência de isolados resistentes foi maior em 2016. Ainda, os testes de susceptibilidade aos sanitizantes revelaram que apenas 2 isolados de 2006 e outros 2 isolados de 2016 foram sensíveis aos dois sanitizantes testados frente a todas as condições impostas.

4.2 Concentração Inibitória Mínima (MIC) de antimicrobianos

Os valores de *breakpoint* clínico foram utilizados para estabelecer os perfis fenotípicos dos isolados analisados. Nos isolados de 2006, não foi detectada resistência ao cloranfenicol e à ciprofloxacina. Para o antimicrobiano ácido nalidíxico, foi detectada resistência em 10 (50%) isolados, enquanto que para enrofloxacin, gentamicina e tetraciclina a resistência foi observada em apenas 1 (5%) isolado cada (TABELA 5). Dentre os isolados, 8 (40%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados (TABELA 7).

Os isolados do ano de 2016 também não apresentaram resistência ao cloranfenicol e à ciprofloxacina. Para os antimicrobianos ácido nalidíxico, enrofloxacin, gentamicina e tetraciclina foi observada resistência em 13 (65%), 4 (20%), 6 (30%) e 15 (75%) isolados, respectivamente (TABELA 6). Entre os isolados, 4 (20%) foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados e 5 (25%) foram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo assim considerados multirresistentes (TABELA 7).

TABELA 5 – Resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados de *S. Heidelberg* do ano de 2006 frente aos diferentes antimicrobianos avaliados.

ATM ^a	Frequência (%) de isolados com MIC (µg/mL) igual a:																nWT ^b (%)	R ^c (%)
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128			
NAL	-	-	-	-	-	-	-	20,0	30,0	0	0	0	0	0	50,0	50,0	50,0	
CIP	50,0	0	0	45,0	0	0	0	5,0	0	0	0	0	-	-	-	5,0	0	
CL	-	-	-	-	-	-	-	-	100	0	0	0	0	0	0	0	0	
ENO	5,0	45,0	5,0	0	15,0	25,0	0	0	5,0	0	0	0	-	-	-	0	5,0	
GEN	-	-	-	-	-	5,0	65,0	20,0	0	0	5,0	0	5,0	0	0	10,0	5,0	
TET	-	-	-	-	-	-	80,0	15,0	0	0	0	0	5,0	0	-	5,0	5,0	

^a Antimicrobianos (ATM) avaliados: ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CL), enrofloxacina (ENO), gentamicina (GEN) e tetraciclina (TET).

^b Isolados *non-wild type* (nWT), conforme valores ECOFF.

^c Isolados resistentes (R), conforme valores de *breakpoint* clínicos.

As linhas verticais sólidas indicam os valores ECOFF, enquanto que as pontilhadas indicam os valores de *breakpoint* clínicos, quando diferem dos valores ECOFF correspondentes.

TABELA 6 – Resultado da Concentração Inibitória Mínima (MIC) dos isolados de *S. Heidelberg* do ano de 2016 frente aos diferentes antimicrobianos avaliados.

ATM ^a	Frequência (%) de isolados com MIC (µg/mL) igual a:																nWT ^b (%)	R ^c (%)
	0,008	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128			
NAL	-	-	-	-	-	-	-	20,0	5,0	0	5,0	5,0	0	0	0	65,0	65,0	65,0
CIP	25,0	0	0	60,0	0	15,0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	15,0	0
CL	-	-	-	-	-	-	-	-	90,0	10,0	0	0	0	0	0	0	0	0
ENO	5,0	15,0	5,0	0	20,0	35,0	20,0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	20,0
GEN	-	-	-	-	-	0	55,0	15,0	0	0	0	5,0	15,0	10,0	0	0	30,0	30,0
TET	-	-	-	-	-	-	25,0	0	0	0	0	0	35,0	40,0	-	-	75,0	75,0

^a Antimicrobianos (ATM) avaliados: ácido nalidíxico (NAL), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CL), enrofloxacina (ENO), gentamicina (GEN) e tetraciclina (TET).

^b Isolados *non-wild type* (nWT), conforme valores ECOFF.

^c Isolados resistentes (R), conforme valores de *breakpoint* clínicos.

As linhas verticais sólidas indicam os valores ECOFF, enquanto que as pontilhadas indicam os valores de *breakpoint* clínicos, quando diferem dos valores ECOFF correspondentes.

TABELA 7 – Distribuição dos perfis fenotípicos de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *S. Heidelberg* nos anos de 2006 e 2016.

Perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos	Nº de classes de antimicrobianos	Isolados (%) Ano 2006	Isolados (%) Ano 2016
NAL, ENO, GEN, TET	3	-	2 (10%)
ENO, GEN, TET	3	-	1 (5%)
NAL, GEN, TET	3	-	2 (10%)
NAL, ENO, TET	2	-	1 (5%)
GEN, TET	2	1 (5%)	1 (5%)
NAL, TET	2	-	7 (35%)
NAL, ENO	1	1 (5%)	-
TET	1	-	1 (5%)
NAL	1	9 (45%)	1 (5%)
Sensível para todos ^a	4	8 (40%)	4 (20%)
MIC - Intermediário	-	1 ^b (5%)	-

NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, ENO: enrofloxacina, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina.

^a Sensível para todos os antimicrobianos, incluindo cloranfenicol.

^b 1 isolado classificado como Intermediário frente à gentamicina.

Os valores de ECOFF também foram utilizados para avaliar os isolados classificados como nWT (FIGURA 3). Para o ano de 2006, cloranfenicol e enrofloxacina foram os únicos antimicrobianos que não apresentaram isolados nWT. As frequências para ácido nalidíxico e gentamicina foram de 50% e 10%, enquanto que para ciprofloxacina e tetraciclina foram de 5% cada. Já para os isolados do ano de 2016, cloranfenicol e enrofloxacina também não apresentaram isolados nWT, enquanto que ácido nalidíxico, ciprofloxacina, gentamicina e tetraciclina apresentaram frequências de 65%, 15%, 30% e 75% dos isolados nWT, respectivamente.

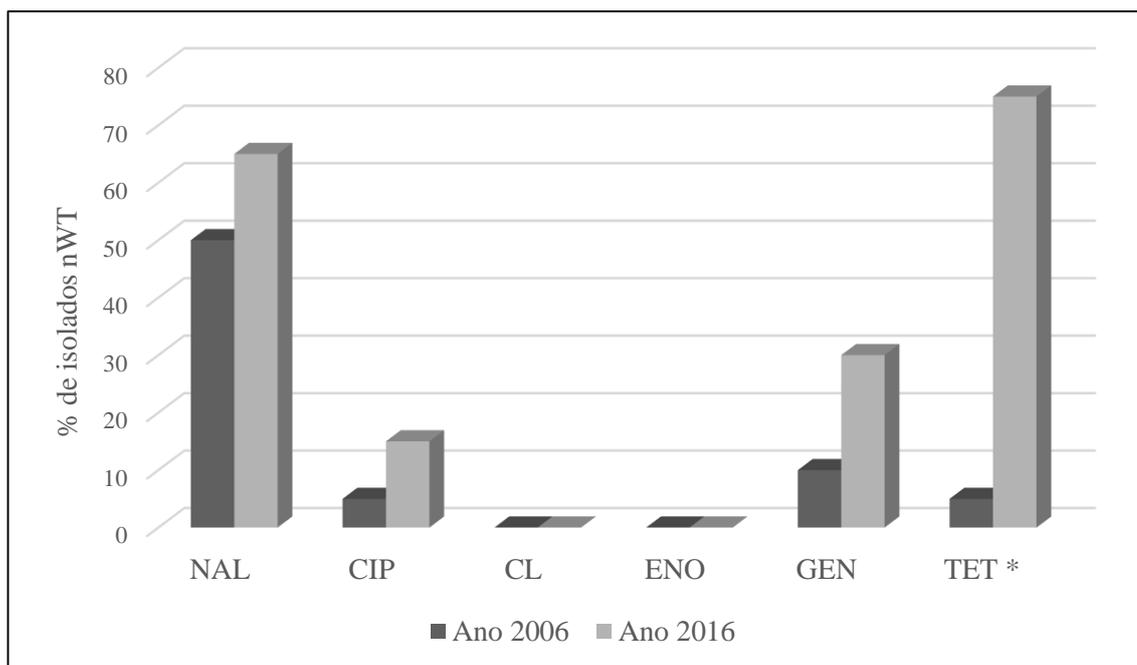


FIGURA 3 – Porcentagem de isolados de *S. Heidelberg* nWT em 2006 e 2016. nWT: *non-wild type*, NAL: ácido nalidíxico, CIP: ciprofloxacina, CL: cloranfenicol, ENO: enrofloxacin, GEN: gentamicina, TET: tetraciclina. * $p < 0,05$: há diferença significativa entre os dois períodos testados.

A cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 utilizada em todos os ensaios apresentou valores de MIC dentro dos parâmetros estabelecidos pelo CLSI. A contagem das placas inoculadas, realizada através de uma alíquota da suspensão da cepa semeada em ágar TSA, confirmou a concentração estabelecida para o método que era de 2 a 8×10^5 UFC/mL e, assim, garantiu que as diluições dos microrganismos foram realizadas de forma correta.

5 DISCUSSÃO

O teste de eficiência dos sanitizantes hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio foi realizado para avaliar a resistência dos isolados testados em fase planctônica. Foram utilizadas concentrações e tempo recomendados pelo fabricante, além de concentrações inferiores em relação às concentrações recomendadas.

Os resultados de eficiência do sanitizante hipoclorito de sódio encontrados no presente trabalho foram muito favoráveis. Apenas dois isolados do ano 2006 mostraram-se resistentes aos 5 minutos de contato e concentração de 0,5%. Para todas as demais amostras, independentemente da concentração utilizada, o sanitizante foi eficiente já aos 5 minutos de contato. Os resultados obtidos vão de encontro a outros estudos, em que houve sensibilidade das amostras de *Salmonella* perante o hipoclorito de sódio (JAENISCH *et al.*, 2010; RIAZI; MATTHEWS, 2011). Machado *et al.* (2010) encontraram 100% dos isolados de *Salmonella* sensíveis ao hipoclorito de sódio na concentração recomendada pelo fabricante (2%), assim como Kich *et al.* (2004) que detectaram 100% de sensibilidade em isolados de *S. Typhimurium* para hipoclorito de sódio a 1%, independentemente do tempo de contato e temperatura testados. É importante destacar que mesmo na presença de matéria orgânica, o hipoclorito de sódio foi eficiente nas duas concentrações testadas. Devido a este motivo, além de possuir boa efetividade contra uma grande variedade de microrganismos e por ser ativo mesmo em baixas concentrações, os hipocloritos têm sido amplamente utilizados na indústria de alimentos (ANDRADE; MACEDO, 1996).

Os testes realizados com cloreto de benzalcônio não resultaram em 100% de eficiência, como o hipoclorito de sódio. Em estudo realizado por Colla *et al.* (2012b), foi encontrada eficiência de 100% da amônia quaternária na concentração 0,5% com tempo de contato de 10 minutos, sobre isolados de *S. Heidelberg* de origem aviária, enquanto que em estudo posterior, amônia quaternária em concentração maior (1%) demonstrou efetividade diminuída em isolados de *Salmonella* – 89,2% com 10 minutos de contato e 97,3% após 15 minutos de contato (COLLA *et al.*, 2014). Cardoso *et al.* (2008) detectaram sensibilidade em apenas 8,75% dos isolados de *S. Enteritidis* quando da realização do teste com o sanitizante e 20 minutos de contato. Ainda, Machado *et al.* (2010) encontraram isolados de *Salmonella* resistentes a quaternário de amônia na concentração de 200 ppm e com tempo de exposição de 20 minutos, corroborando com os resultados obtidos no presente trabalho.

A tolerância dos isolados ao cloreto de benzalcônio pode ocorrer devido à presença de matéria orgânica (MCDONELL; RUSSELL, 1999; RODGERS *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2002; KICH *et al.*, 2004; GREZZI, 2007), uma vez que ela é responsável por proteger o microrganismo e impedir o contato necessário com o sanitizante ou até mesmo inativar alguns produtos (FAVERO; BOND, 1991). Portanto, o mecanismo de ação do cloreto de benzalcônio pode estar mais relacionado às condições de utilização do produto, principalmente na presença de matéria orgânica, do que com um provável perfil de resistência de *Salmonella* spp. (KICH *et al.*, 2004), ainda que a resistência aos compostos de quaternário de amônio seja um problema potencial na indústria de alimentos (SUNDHEIM *et al.*, 1998).

Uma explicação para a tolerância ao cloreto de benzalcônio é de que nas bactérias Gram-negativas, como a *Salmonella*, derivados do quaternário de amônio tem eficácia reduzida pois a membrana externa, com sua camada de lipopolissacarídeos, atua como uma barreira contra condições externas prejudiciais (NIKAIDO *et al.*, 2003; BRAGG *et al.*, 2014). Outro possível mecanismo de resistência ao cloreto de benzalcônio é devido ao sistema de bombas de efluxo. Em *Salmonella*, existem pelo menos nove genes do sistema de efluxo de drogas, dos quais três (AcrAB, AcrEF e MdsABC) são conhecidos por expulsar o cloreto de benzalcônio da célula (MØRETRØ *et al.*, 2012). Randall *et al.* (2007) verificaram a necessidade de um sistema de efluxo para a resistência de *S. Typhimurium* a três sanitizantes derivados de quaternário de amônio.

Outro ponto a ser observado nos resultados obtidos através do teste com cloreto de benzalcônio foi a maior eficiência do sanitizante quando a temperatura utilizada foi a de 25 °C. Alguns trabalhos não reportam diferença entre as temperaturas utilizadas para testes com *Salmonella* (KICH *et al.*, 2004; STRINGFELLOW *et al.*, 2009; JAENISCH *et al.*, 2010). No entanto, Camilotti *et al.* (2015) detectaram que o cloreto de benzalcônio teve sua atividade comprometida a 8°C, sendo mais eficiente em temperatura de 20°C quando testado em isolados de *S. Hadar*. Outros estudos obtiveram os mesmos resultados em temperaturas inferiores, corroborando com os resultados aqui apresentados (TUNCAN, 1993; TAYLOR *et al.*, 1999).

Os resultados dos testes de eficiência de sanitizantes demonstram a importância desta avaliação a fim de definir programas de sanitização que visem à eleição de princípios ativos adequados ao ambiente em questão, juntamente com a adequação do tempo de ação dos produtos. Discrepâncias são observadas entre os estudos que avaliam a ativi-

dade de sanitizantes, tais divergências podem ocorrer em virtude das diferenças metodológicas, origens das cepas utilizadas, tempos de contato, formulações dos produtos e concentrações testadas. Portanto, sugere-se a padronização dos experimentos que utilizam sanitizantes a fim de se obter resultados precisos e aplicáveis (BOROWSKY *et al.*, 2006).

O teste de MIC também foi realizado com o intuito de avaliar a susceptibilidade dos isolados frente à seis antimicrobianos: ácido nalidíxico, ciprofloxacina, cloranfenicol, enrofloxacina, gentamicina e tetraciclina. Como citado anteriormente, os valores de ECOFF são utilizados para detectar os mecanismos de resistência e monitorar o desenvolvimento da resistência em determinada população microbiana (KAHLMETER *et al.*, 2003; EFSA, 2012). Portanto, no presente trabalho, esses valores foram utilizados para determinar populações nWT de 20 isolados de *S. Heidelberg* do ano de 2006 e outros 20 isolados de 2016, todos provenientes de fontes avícolas.

Através da determinação de MIC, realizada em microdiluição em caldo, foi possível estabelecer que houve uma progressão significativa nas taxas de populações nWT para o fármaco tetraciclina, passando de 5% para 75% de um período para outro. Inúmeros estudos tem encontrado altos níveis de resistência à tetraciclina em amostras de *Salmonella* isoladas de fontes avícolas (BUSANI *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2006; CHUANHUEN *et al.*, 2008b; RIBEIRO *et al.*, 2008; THAI *et al.*, 2012; ASGHARPOUR *et al.*, 2014; PANDINI *et al.*, 2014; SARMIENTO, 2016). Outros estudos revelam a resistência de *S. Heidelberg* à tetraciclina (ZHAO *et al.*, 2008; HAN *et al.*, 2011; GIERALTOWSKI *et al.*, 2016). Em pesquisa semelhante, Mion *et al.* (2014), avaliaram *S. Heidelberg* isoladas em 2005 e 2009, e detectaram um aumento de resistência à doxiciclina (classe das tetraciclinas) de 7,6% para 33,3%.

Os antimicrobianos da classe das tetraciclinas foram amplamente utilizados de maneira profilática em rações de frangos de corte no Brasil até 1998, quando seu uso foi vetado em aditivos alimentares para animais (BRASIL, 1998). Entretanto, um levantamento realizado em 2005 pela Secretaria de Estado da Saúde do Paraná em 28 cooperativas integradas e abatedouros de frango de corte do Estado, detectou o uso das tetraciclinas como promotores de crescimento (6%) e também na terapêutica (11%), ainda que no Brasil seja proibido seu uso para estes fins na cadeia de frango de corte (SESA, 2005). Portanto, a utilização indevida deste fármaco pode estar levando à progressão da resistência de *Salmonella* e outros patógenos e, conseqüentemente, limitando as opções terapêuticas.

Além disso, a resistência pode estar relacionada à difusão dos diversos genes *tet* que conferem resistência de *Salmonella* à tetraciclina (PEZZELLA *et al.*, 2004). São

descritos mais de 35 diferentes genes que estão relacionados a bombas de efluxo associadas à membrana. Os genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* e *tetG* têm sido encontrados em *Salmonella*, sendo *tetA* e *tetB* os mais frequentes (FRECH; SCHWARZ, 2000; MICHAEL *et al.*, 2006; HAN *et al.*, 2011).

Segundo Frye e Jackson (2013), patógenos oportunistas e bactérias comensais, como *Escherichia coli* e *Enterococcus*, isolados de alimentos de origem animal e onde detectou-se resistência a determinado número de antimicrobianos, podem servir como reservatório para genes de resistência e, através de elementos genéticos móveis, transferi-los para *Salmonella* e outros patógenos. Desta forma, a progressão da resistência à tetraciclina também pode estar relacionada à presença de plasmídeos ou transposons que, por carregarem genes de resistência ao fármaco associados a genes de resistência de outras classes antimicrobianas, continuam sofrendo pressão seletiva.

O percentual de isolados nWT para gentamicina foi relativamente baixo no presente estudo: 10% para os isolados de *S. Heidelberg* de 2006 e 30% para os isolados de 2016, porém sem diferença significativa ($p > 0,05$). Outros estudos também identificaram baixos índices de isolados de *Salmonella* resistentes à gentamicina (RIBEIRO *et al.*, 2008; CUI *et al.*, 2009; PANDINI *et al.*, 2014; MENDONÇA, 2016; SAIFUDDIN *et al.*, 2016). Em trabalhos recentes, Gieraltowski *et al.* (2016) encontraram resistência de *S. Heidelberg* à gentamicina e Mion *et al.* (2014) detectaram progressão da resistência à gentamicina em isolados de *S. Heidelberg* de 2005 e 2009. Os baixos níveis de isolados resistentes a este fármaco podem ser explicados pela rara utilização da gentamicina na cadeia avícola (GIACOMELLI *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos neste estudo também demonstraram altos índices de isolados nWT para ácido nalidíxico, uma quinolona de primeira geração, tanto em 2006 (50%) quanto em 2016 (65%), corroborando com outros trabalhos com *Salmonella* spp. disponíveis na literatura (DUARTE *et al.*, 2009; BRASIL, 2012b; NEVES, 2014; PANDINI *et al.*, 2014; SARMIENTO, 2016). A resistência detectada provavelmente deve-se ao fato de que o ácido nalidíxico foi utilizado por muitos anos na terapia avícola (NEVES, 2014). Normalmente, a resistência às quinolonas está ligada aos seguintes mecanismos: presença de bombas de efluxo ativo, mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* e diminuição da permeabilidade da membrana. O modo de envolvimento de cada um não é totalmente elucidado e sugere-se um processo cumulativo destes mecanismos no que diz respeito à resistência de *Salmonella* às quinolonas (CLOECKAERT; CHASLUS-DANCLA, 2001; PIDDOCK, 2002; GIRAUD *et al.*, 2006).

Ao contrário do que acontece com as quinolonas de primeira geração, os níveis de resistência às fluoroquinolonas, como a enrofloxacin e ciprofloxacina, são baixos entre isolados de *Salmonella* (DALLAL *et al.*, 2010; DANMAP, 2013; PANZENHAGEN *et al.*, 2016; PROROGA *et al.*, 2016). Zhao *et al.* (2008), verificaram que 100% de seus isolados de *S. Heidelberg* eram sensíveis à ciprofloxacina, corroborando com o presente estudo.

Embora o número de isolados nWT para enrofloxacin e ciprofloxacina tenha sido baixo tanto para os isolados de 2006 quanto para os de 2016, é criterioso avaliar constantemente a susceptibilidade dos isolados frente a essas drogas e assim observar as características de resistência de *S. Heidelberg*, com o intuito de verificar se os fármacos administrados nas aves estão sendo devidamente utilizados na produção animal. A administração cuidadosa de agentes antimicrobianos juntamente com a vigilância contínua são iniciativas importantes que ajudam a definir o melhor tratamento e inibem ou dificultam a seleção e propagação de isolados resistentes (VOSS-RECH *et al.*, 2015). Além disso, deve-se ter especial atenção à resistência de isolados às fluoroquinolonas pois na medicina humana são consideradas os antibióticos de eleição para o tratamento de *Salmonella* spp. (BERTRAND *et al.*, 2006; POKHAREL *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2010).

O cloranfenicol apresentou 100% de isolados WT em ambos os períodos. Resultados similares, onde houve grande sensibilidade ao antimicrobiano, foram relatados em estudos anteriores com *Salmonella* (OKAMOTO *et al.*, 2009; SARMIENTO, 2016). Zhao *et al.* (2008), encontraram apenas 1% de isolados de *S. Heidelberg* resistentes ao cloranfenicol e Mion *et al.* (2014) não detectaram resistência nos isolados de *S. Heidelberg* de 2005 e 2009, indicando a não progressão de resistência à droga através dos anos. A sensibilidade ao cloranfenicol pode ser justificada devido ao impedimento do uso em animais de produção em diferentes países. No Brasil, em especial, está proibido desde 2003 (BRASIL, 2003a). Porém, seu análogo sintético fluorado, o florfenicol, foi aprovado para tratamento veterinário. Em um estudo avaliando a resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango no Brasil, detectou-se fenótipo de sensibilidade ao cloranfenicol e resistência ao florfenicol, demonstrando assim a ausência da pressão seletiva exercida pelo cloranfenicol tendo em vista a proibição de seu uso pelo MAPA (BRASIL, 2012b).

A ocorrência de isolados de *S. Heidelberg* do ano de 2016 com perfil multirresistente indica grande preocupação pela ascensão da multirresistência a antimicrobianos e pode estar associada, além da utilização inadequada de fármacos na avicultura industrial,

à disseminação de genes de resistência à essas substâncias. O PREBAF enfatiza a importância de caracterizar os clones multirresistentes quanto a sua capacidade de carrear e disseminar genes de resistência a antimicrobianos (BRASIL, 2012a).

6 CONCLUSÃO

No presente trabalho, foi reportada a presença de resistência ao cloreto de benzalcônio e aos antimicrobianos em *S. Heidelberg* isoladas de fontes avícolas. Portanto, é importante considerar que a resistência encontrada ao sanitizante cloreto de benzalcônio indica a necessidade do cuidado na escolha da concentração utilizada, a fim de evitar que patógenos sejam expostos a concentrações sub-inibitórias e, com isso, adquiriram mecanismos de resistência. Além disso, os resultados encontrados demonstram que há progressão da resistência de *S. Heidelberg* aos antimicrobianos com o passar do tempo, o que implica no aparecimento de isolados multirresistentes. Ações devem ser tomadas com o intuito de incentivar o uso prudente desses fármacos na medicina humana e, principalmente, em qualquer que seja a área de produção animal.

REFERÊNCIAS

- AASE, B.; SUNDHEIM, G.; LANGSRUD, S.; RØRVIK, L. M. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, n. 1-2, p. 57-63, dez. 2000.
- ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2016**. Disponível em: < http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_rela-torio_anual_2016_portugues_web1.pdf > Acesso em: dez. 2016.
- ALEKSHUN, M. N.; LEVY, S. B. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037-50, 2007.
- ALTERTHUM, F. Controle dos micro-organismos/Origem e natureza química dos principais agentes antibacterianos/Mecanismos de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015, p. 57-86.
- ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. 22 ed., São Paulo: Varela, 2008, 412 p.
- ANDRADE, N. J.; MACEDO, J. A. Agente químicos para higienização. In: _____ **Higienização na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1996, p. 53-137.
- BACK, A. *Salmonella* Heidelberg é líder absoluta entre variantes no sul do país. **O Presente Rural**, 11 de agosto de 2016. Disponível em: < <http://opresenterural.com.br/noticia/salmonella-heidelberg-e-lider-absoluta-entre-variantes-no-sul-do-pais/8105/> > Acesso em: jan. 2017.
- BARROW, P. A.; JONES, M. A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J.; THOEN, C. O. (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, 4th Edition. Iowa: Wiley-Blackwell, 2010, p. 231-265.
- BAŞ, M.; ERSUN, A. Ş.; KIVANÇ, G. The evaluation of food hygiene knowledge, attitudes, and practices of food handlers' in food businesses in Turkey. **Food Control**, v. 17, n. 4, p. 317-322, 2006.

BERNDT, A.; WILHELM, A.; JUGERT, C.; PIEPER, J.; SACHSE, K.; METHNER, V. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. **Infect Immun**, Washington, v. 75, n. 12, p. 5993-6007, 2007.

BERTRAND, S.; WEILL, F.-X.; CLOECKAERT, A.; VRINTS, M.; MAIRIAUX, E.; PRAUD, K.; DIERICK, K.; WILDEMAUVE, C.; GODARD, C.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H.; GRIMONT, P. A.; COLLARD, J. M. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2897-903, ago. 2006.

BOROWSKY, L. M.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. I.; AVANCINI, C. A. M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes quaternário de amônio e iodóforo. **Ciência Rural**, v. 36, p. 1474-1479, 2006.

BORSOI, A. **Inoculação de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis em pintos de corte para avaliação da morfometria cecal, invasibilidade, persistência de excreção fecal e o uso de ácidos orgânicos e óleos essenciais no controle de *Salmonella* Enteritidis**. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

BRAGG, R.; JANSEN, A.; COETZEE, M.; VAN DER WESTHUIZEN, W.; BOUCHER, C. Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, mar. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF**. 2012a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório de Pesquisa em Vigilância Sanitária de Alimentos**. Brasília. 171 p. 2012b. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES> > Acesso em: fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. **Diário Oficial da União**, DF, 30 junho de 2003a, Seção 1, p. 4.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 70, de 06 de outubro de 2003. Aprova o Programa de redução de patógenos - monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus. **Diário Oficial da União**, DF, 10 de outubro de 2003b, Seção 1, p. 226.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária de carne de aves. **Diário Oficial da União**, 5 de março de 1999, seção 1, p. 17.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Normativa n° 26, de 09 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. **Diário Oficial da União**, DF, 10 de julho de 2009, Seção 1, p. 14.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria Ministerial n° 193, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial da União**, DF.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 101, de 17 de agosto de 1993. Métodos de análise microbiológica para alimentos. **Diário Oficial da União**, DF, 17 de agosto de 1993, Seção 1, p. 11937.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Aditivos melhoradores de desempenho e anticoccidianos registrados na CPAA/DFIP**, de 25 de abril de 2015. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/ADITIVOSAUTORIZADOS-COMOMDeANTICOCCIDIANOS201525abrilPortalMAPA.pdf> > Acesso em: jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 14, de 28 de fevereiro de 2007. **Aprovação dos Produtos Antimicrobianos**. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/27931> > Acesso em: out. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**, Dezembro de 2016. Disponível em: < <http://portalarquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2016/dezembro/09/Apresentacao-Surtos-DTA-2016.pdf> > Acesso em: jan. 2017.

BUSANI, L.; GRAZIANI, C.; BATTISTI, A.; FRANCO, A.; RICCI, A.; VIO, D.; DIGIANNATALE, E.; PATERLINI, F.; D'INCAU, M.; OWCZAREK, S.; CAPRIOLI,

A.; LUZZI, I. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. **Epidemiology and Infection**, v. 132, p. 245-251, 2004.

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

CABRERA, C. E.; GÓMEZ, R. F.; ZUÑIGA, A. E. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. **Colombia Médica**, v. 38, n. 2, p. 149-158, abr./jun. 2007.

CAMILOTTI, E.; ROCHA, S. L. S.; TEJKOWSKI, T. M.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; AVANCINI, C. A. M. Simulação de condições de uso de quaternário de amônio frente amostras de *Salmonella* Hadar isoladas de carcaças de frango. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 1, p. 66-72, jan./mar. 2015.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015, p. 351-360.

CANTO, E. L. **Ciências Naturais: Aprendendo com o Cotidiano**. v. 9, Moderna, 2011.

CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; SANTOS, L. R.; BORSOI, A.; PILOTTO, F.; ROCHA, S. L. S.; NASCIMENTO, V. P. In vitro efficiency of disinfectants against *Salmonella* Enteritidis samples isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 2, p. 139-141, jun. 2008.

CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; SANTOS, L. R.; PILOTTO, F.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; ROCHA, S. L. S.; NASCIMENTO, V. P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 368-371, 2006.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **An atlas of Salmonella in the United States, 1968-2011**: laboratory-based enteric disease surveillance. 2013. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, Atlanta, Georgia, USA.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella*. 2015. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/salmonella/index.html> > Acesso em: dez. 2016.

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

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. Biofilme formation and control in food processing facilities. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 2, n. 1, p. 22-32, jan. 2003.

CHUANCHUEN, R.; KOOWATANANUKUL, C.; KHEMTONG, S. Characterization of class 1 integrons with unusual 3' conserved region from *Salmonella enterica* isolates. **Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health**, v. 39, n. 3, p. 419-24, mai. 2008a.

CHUANCHUEN, R.; PATHANASOPHON, P.; KHEMTONG, S.; WANNAPRASAT, W.; PADUNGTOD, P. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 70, n. 6, p. 595-601, 2008b.

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

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard - Fourth Edition. CLSI Document VET01-A4. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2013a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Second Information Supplement. CLSI Document VET01-S2. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2013b.

COLLA, F. L.; MION, L.; PARIZOTTO, L.; SANTOS, L. A.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. 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**, v. 34, n. 4, p. 320-324, abr. 2014.

COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; BORSOI, A.; DICKEL, E. L.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arquivo Instituto Biológico**, v. 79, n. 4, p. 603-606, out./dez. 2012a.

COLLA, F. L.; RODRIGUES, L. B.; DICKEL, E. L.; BORSOI, A.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. 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**, v. 32, n. 4, p. 289-292, 2012b.

CONTRERAS, C. J.; BROMBERG, R.; CIPOLLI, K. M. V. A. B; MIYAGUSKU, L. **Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados**. São Paulo: Varela, 1. ed., 2003, 210 p.

CONY, A. V.; ZOCCHÉ, A. T. Manejo de frango de corte. In: MENDES, A. A.; NAAS, I. A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: Facta, 2004, p. 117-136.

CUI, S.; LI, J.; SUN, Z.; HU, C.; JIN, S.; LI, F.; GUO, Y.; RAN, L.; MA, Y. Characterization of *Salmonella enterica* isolates from infants and toddlers in Wuhan, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 87-94, 2009.

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

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark, 2015. **National Food Institute**. Disponível em: < <http://www.danmap.org/Downloads/Reports.aspx> > Acesso em: mar. 2017.

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

DICKEL, E.L. **Utilização da técnica microbiológica convencional, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e ensaio imunoenzimático (ELISA) no monitoramento de *Salmonella* em carcaças de frango para o controle higiênico sanitário do processo de abate**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

DROUIN, F.; MÉLAÇON, J.; ROY, P. H. The *intI*-like tyrosine recombinase of *Shewanella oneidensis* is active as an integron integrase. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 6, p. 1811-15, mar. 2002.

DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; ANDRADE, P. L. A.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 569-573, 2009.

EFSA. European Food Safety Authority. **EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella***. 2014. Disponível em: < http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf > Acesso em: nov. 2016.

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

EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. **The European Food Safety Authority Journal**, v. 1, n. 13, 169 p., 2015.

EGAN, M. B.; EGAN, M. B.; RAATS, M. M.; GRUBB, S. M.; EVES, A.; LUMBERS, M. L.; DEAN, M. S.; ADAMS, M. R. A review of food safety and food hygiene training studies in the commercial sector. **Food Control**, v. 18, n. 10, p.1180-1190, 2007.

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

FAVERO, M. S.; BOND, W. W. Sterilization, disinfection, and antisepsis in the hospital. *In*: BALOWS, A. **Manual of Clinical Microbiology**. Washington DC: American Society for Microbiology, p. 183-200, 1991.

FOLEY, S. L.; LYNNE A. M. Food animal-associated *Salmonella* challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 173-187, 2008.

FOLEY, S. L.; NAYAK, R.; HANNING, I. B.; JOHNSON, T. J.; HAN, J.; RICKE, S. C. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273-79, 2011.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p.

FRECH, G.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. **J. Appl. Microbiol.**, v. 89, p. 633-641, 2000.

FRYE, J. G; JACKSON, C. R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus* spp. isolated from U. S. food animals. **Frontiers Microbiology**, v. 4, n. 135, p. 1-22, mai. 2013.

GAST, R. K. *Salmonella* infections. In: SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of Poultry**. 12 ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 619-631.

GAZE, W. H.; ABDOUSLAM, N.; HAWKEY, P. M.; WELLINGTON, W. M. H. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1802-07, mai. 2005.

GIACOMELLI, M.; SALATA, C.; MARTINI, M.; MONTESISSA, C.; PICCIRILLO, A. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in Italy. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 2, p. 181-188, abr. 2014.

GIERALTOWSKI, L.; HIGA, J.; PERALTA, V.; GREEN, A.; SCHWENSOHN, C.; ROSEN, H.; LIBBY, T.; KISSLER, B.; MARSDEN-HAUG, N.; BOOTH, H.; KIMURA, A.; GRASS, J.; BICKNESE, A.; TOLAR, B.; DEFIBAUGH-CHÁVEZ, S.; WILLIAMS, I.; WISE, M. National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. **Plos One**, v. 11, n.9, 13 p., set. 2016.

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R. D.; DOWLING, P. M. **Terapia antimicrobiana em medicina veterinária**. 4 ed. São Paulo: Roca, 2010. 683 p.

GIRAUD, E.; BAUCHERON, S. CLOECKAERT, A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 193-194, 2006.

GREZZI G. Limpeza e desinfecção na avicultura. *In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA*, 2007, Campinas, SP. **Anais...** Campinas, SP: FACTA, 2007, p. 161-182.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, 9th Edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. **Institute Pasteur**, Paris, 2007. Disponível em: <<https://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-000036-089>> Acesso em: nov. 2016.

HALL, R. M.; BROWN, H. J.; BROOKES, D. E.; STOKES, H. W. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 20, p. 6286-94, out. 1994.

HAN, J.; DAVID, D. E.; DECK, J.; LYNNE, A. M.; KALDHONE, P.; NAYAK, R.; STEFANOVA, R.; FOLEY, S. L. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from human patients with those from animal and food sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 1130-1133, 2011.

HAO, H.; PAN, H.; AHMAD, I.; CHENG, G.; WANG, Y.; DAI, M.; TAO, Y.; CHEN, D.; PENG, D.; LIU, Z.; HUANG, L.; YUAN, Z. Susceptibility breakpoint of enrofloxacin against swine *Salmonella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 9, p. 3070-3072, set. 2013.

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

HUET, A. A.; RAYGADA, J. L.; MENDIRATTA, K.; SEO, S. M.; KAATZ, G. W. Multidrug efflux pump overexpression in *Staphylococcus aureus* after single and multiple *in vitro* exposures to biocides and dyes. **Microbiology**, v. 154, p. 3144-53, out. 2008.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 819-830, 2012.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; GUIBOURDENCHE, M.; PINNA, E.; NAIR, S.; FIELDS, P. I.; WEILL, F. X. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the Whitee-Kauffmanne-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526-530, set. 2014.

JAENISCH, F. R. F.; COLDEBELLA, A.; MACHADO, H. G. P.; ABREU, P. G.; ABREU, A. M. N.; SANTIAGO, V. **Importância da higienização na produção avícola**. Embrapa Suínos e Aves. Comunicado Técnico, n. 363, Concórdia/SC, dez. 2004.

JAENISCH, F. R. F.; KUCHIISHI, S. S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 384-388, fev. 2010.

KAHLMETER, G.; BROWN, D. F. J.; GOLDSTEIN, F. W.; MACGOWAN, A. P.; MUTON, J. W.; ÖSTERLUND, A.; RODLOFF, A.; STEINBAKK, M.; URBASKOVA, P.; VATOPOULOS, A. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 145-148, ago. 2003.

KICH, J. D.; BOROWSKY, L. M.; SILVA, V. S.; RAMENZONI, M.; TRIQUES, N.; KOOLER, F. L.; CARDOSO, M. R. I. Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 33-39, 2004.

KÖHLER, T.; MICHÉA-HAMZEHPUR, M.; HENSE, U.; GOTOH, N.; CURTY, L. K.; PECHÈRE, J. Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multi-drug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 345-54, 1997.

KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOCER, I.; FARAH, S. M. S. S.; ABRAHÃO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica dos surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no estado do Paraná. **Acta Scenarium. Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.

KUANA, S. L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. *In*: JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das aves**. Campinas/SP: FACTA, 2 ed., p. 21-38, 2009.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M. S.; HEIR, E.; HOLCK, A. L. Bacterial disinfectant resistance - a challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 51, n. 4, p. 283-290, jun. 2003.

LI, X.; LIVERMORE, D. M.; NIKAIDO, H. Role of efflux pump (s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 8, p. 1732-41, 1994.

LORETO, E.; FERREIRA, H. B. Elementos genéticos móveis. *In*: ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Artmed, 4. ed., p. p. 185-203, 2012.

MACEDO, J. A. B.; OLIVEIRA, F. S. Desinfecção secundária: o estado da arte do processo desinfecção em ETA's, com redução de custos operacionais e garantia da qualidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 3, n. 2, mar./jun. 2010.

MACHADO, T. R. M.; MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 475-481, 2010.

MAILLARD, J. Y.; MCDONNELL, G. Selection and use of disinfectants. **In Practice**, v. 34, pag. 292-299, mai. 2012.

MARKEY, B.; LEONARD, F.; ARCHAMBAULT, M.; CULLINANE, A.; MAGUIRE, D. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Edinburgh: Elsevier, 2013, p. 255-266.

MARTINO, M. D. V. Métodos para detecção do perfil de sensibilidade das bactérias aos antibióticos. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015, p. 93-97.

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016. 134 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MELO, A. D. B. O futuro dos antimicrobianos na produção animal. **Avicultura Industrial**, n. 07, ano 105, Ed. 1235, p. 56-58, 2014.

MICHAEL, G. B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes Infections**, v. 8, p. 1898-914, 2006.

MIDELET, G.; CARPENTIER, B. Impact of cleaning and disinfection agents on bio-film structure and on microbial transfer to a solid model food. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n. 2, p. 262-270, 2004.

MION, L.; COLLA, F. L.; CISCO, I. C.; WEBBER, B.; DIEDRICH, L. N.; PILOTTO, F.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R. Perfil de resistência a antimicrobianos por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 1197, jun. 2014.

MOLINA, P. D. S.; KINDLEIN, L.; BERGMANN, G. P.; AVANCINI, C. A. M. Simulação *in vitro* de condições de uso de desinfetantes e avaliação da eficácia frente bactérias sobreviventes a higienização de superfícies em matadouro-frigorífico de bovinos. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 17, p.134-138, 2010.

MØRETRØ, T.; HEIR, E.; NESSE, L. L.; VESTBY, L. K.; LANGSRUD, S. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, p. 532-544, 2012.

MORGULIS, M. S. F. A.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos: Desinfetantes. *In*: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H. S., GORNIK, S. L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. 1 ed., São Paulo/SP: Roca, 2005, p. 105-113.

NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R.; CARDOSO, M. O. **Qualidade microbiológica dos produtos avícolas**. II Simpósio Goiano de Avicultura da Associação Goiana de Avicultura e Escola de Veterinária da UFG, p. 13-17, 1996.

NEVES, G. B. **Diferenças na expressão gênica de isolados de campo e de frigorífico de *Salmonella* resistente aos antimicrobianos e desinfetantes**. 2014. 120 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

NIKAIDO, E.; YAMAGUCHI, A.; NISHINO, K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 35, p. 24245-24253, 2008.

OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI FILHO, R. L.; ROCHA, T. S.; MENCONI, A.; GONÇALVES, G. A. M. Detection and transfer of antimicrobial resistance gene integron in *Salmonella* Enteritidis derived from avian material. **Brazilian Journal Poultry Science**, v. 11, n. 3, p. 195-201, 2009.

PADILLA, G.; COSTA, S. O. P. Genética bacteriana. *In*: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015, p. 37-49.

PAGANO, P. J.; BUCHANAN, L. V.; DAILEY, C. F.; HAAS, J. V.; VAN ENKB, R. A.; GIBSON, J. K. Effects of linezolid on staphylococcal adherence versus time of treatment. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 23, n. 3, p. 226-234, mar. 2004.

PAIXÃO, T. A.; PINTO, J. P. A. N.; SANTOS, R. L. Enfermidades pelo gênero *Salmonella*. *In*: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 478-493.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; MULLER, J. M.; WEBER, L. D.; MOURA, A. C. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. XX, n. X, p. 1-6, 2014.

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

PAULINO, C. A. Antissépticos e desinfetantes. *In*: SPINOSA, H.; GORNIK, S.; BERNARDI, M. **Farmacologia aplicada a medicina veterinária**. 4 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006, p. 441-447.

PAULSEN, I. T.; LITTLEJOHN, T. G.; RADSTROM, P.; SUNDSTROM, L.; SKOLD, O.; SWEDBERG, G.; SKURRAY, R. A. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, n. 4, p. 761-68, abr. 1993.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**, São Paulo: McGraw-Hill, 1990, v. 1, 566 p.

PEREIRA, M. O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (Carbamato e Glutaraldeído) em sistemas de biofilmes**. 2001. 211 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) - Universidade do Minho, Braga - Portugal. 2001.

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

PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 3-16, jan. 2002.

PINHEIRO, S. R.; VASCONCELLOS, S. A.; ITO, F. H.; NETO, J. S. F.; MORAIS, Z. M. Influência da matéria orgânica na atividade micobactericida de cinco desinfetantes de uso pecuário. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 29, n. 1, p. 51-60, 1992.

POKHAREL, B. M.; KOIRALA, J.; DAHAL, R. K.; MISHRA, S. K.; KHADGA, P. K.; TULADHAR, N. R. Multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* (serotypes Typhi and Paratyphi A) from blood isolates in Nepal: surveillance of resistance and a search for newer alternatives. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 434-438, set. 2006.

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

PULIDO-LANDÍNEZ, M.; SANCHÉZ-INGUNZA, R.; GUARD, J.; NASCIMENTO, V. P. Assignment of serotype *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in southern Brazil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 288-294, 2013.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; LEONARD, F. C. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005, 512 p.

RANDALL, L. P.; COOLES, S. W.; COLDHAM, N. G.; PENUELA, E. G.; MOTT, A. C.; WOODWARD, M. J.; PIDDOCK, L. J.; WEBBER, M. A. Commonly used farm disinfectants can select for mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with decreased susceptibility to biocides and antibiotics without compromising virulence. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 6, 1273-1280, dez. 2007.

RIAZI, S.; MATTHEWS, K. R. Failure of foodborne pathogens to develop resistance to sanitizers following repeated exposure to common sanitizers. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 374-378, 2011.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P. 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**, v. 60, n. 5, p. 1259-1262, out. 2008.

RODGERS, J.; MCCULLAGH, J. J.; MCNAMEE, P. T.; SMYTH, J. A.; BALL, H. J. An investigation into the efficacy of hatchery disinfectants against strains of *Staphylococcus aureus* associate with the poultry industry. **Veterinary Microbiology**, v. 82, p. 131-141, 2001.

RODRIGUES, D. P. Dinâmica dos sorovares de *Salmonella* no Brasil. In: Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 10 a 12 de junho de 2013, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2013, p. 1576-157.

RODRIGUES, D. P. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. In: Memória del Seminário Internacional sobre Salmonelose Aviar, 2011, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, 2011, p. 1-7.

ROSTAGNO, M. Nutrição Animal: antimicrobianos em aves. **Avicultura Industrial**. 2010. Disponível em: < <http://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/antimicrobianos-em-aves/20100329-111520-J005> > Acesso em: nov. 2016.

RUSSELL, A. D. Antibiotic and biocide resistance in bacteria: introduction. **Journal of Applied Microbiology**. Symposium Supplement 92, 1S-3S, 2002a.

RUSSELL, A. D. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. **Journal of Hospital Infection**, v. 57, n. 2, p. 97-104, jun. 2004.

RUSSELL, A. D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. **Journal of Hospital Infection**, London, v. 43, p. S57-S58, 1998.

RUSSELL, A. D. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 597-599, abr. 2002b.

SAIFUDDIN, A. K. M.; AZIZUL ISALM, S. K. M.; NURUL ANWAR, M. D. Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* of laying chicken. **Microbes and Health**, v. 5, n. 1, p. 4-6, dez. 2016.

SANTANA, E. S.; OLIVEIRA, F. H.; BARNABÉ, A. C. S.; MENDES, F. R.; ANDRADE, M. A. **Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura**. Centro Científico Conhecer. 2011. 21 p. Disponível em: < <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/uso%20de%20antibioticos.pdf> > Acesso em: nov. 2016.

SARMIENTO, I. A. M. **Diagnóstico microbiológico e molecular de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em carcaças de frango**. 2016. 75 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. 2009.

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

SCHWARZ, S.; SILLEY, P.; SIMJEE, S.; WOODFORD, N.; VAN DUIJKEREN, E.; JOHNSON, A. P.; GAASTRA, W. Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601-604, fev. 2010.

SCUR, M. C.; PINTO, F. G. S.; DE BONA, E. A. M.; WEBER, L. D.; FRUET, T. K.; SORESINI, G. C. G. Atividade de desinfetantes frente a sorotipos de *Salmonella* isolados de granjas avícolas. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, vol. 17, n. 4, out./dez. 2016.

SCVPH - SCIENTIFIC COMMITTEE ON VETERINARY MEASURES RELATING TO PUBLIC HEALTH. **Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on food-borne zoonoses**. Genebra: European Commission. Health & Consumer Protection Directorate - General. Unit B3 - Management of scientific committees II. 2000.

SESA. Levantamento do uso e comercialização de medicamentos veterinários em frango de corte. Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMvet-PR, 2005. **Secretaria de Estado de Saúde do Paraná**. Disponível em: < <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=2337> > Acesso em: mar. 2017.

SILLEY, P. Susceptibility testing methods, resistance and breakpoints: what do these terms really mean? **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 31, n. 1, p. 33-41, 2012.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; MACHADO, I; PEREIRA, M. O.; VIEIRA, M. J. Control of flow-generated biofilms with surfactants: evidence of resistance and recovery. **Food and Bioproducts**, v. 84, n. 4, p. 338-345, 2006.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent bio-film control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, 2010.

SOUZA, E. R. N.; CARVALHO, E. P.; DIONÍZIO, F. L. Estudo da presença de *Salmonella* sp. em poedeiras submetidas a muda forçada. **Ciência Agrotécnica**, v. 26, n. 1, p. 140-147, 2002.

SOUZA, J. B.; DANIEL, L. A. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de matéria orgânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 111-117, 2005.

SOUZA, I. D. P. Heidelberg é a *Salmonella* da vez. **O presente rural - Avicultura**, corte e postura, Paraná, p. 28, fev./mar. 2015.

SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Ciências Agrárias**, v. 31, p. 413-428. 2010.

SUNDHEIM, G.; HAGTVEDT, T.; DAINTY, R. Resistance of meat associated staphylococci to a quaternary ammonium compound. **Food Microbiology**, n. 9, p. 161-167, 1992.

SUNDHEIM, S.; LANGSRUD, E. H.; HOLCK, A. L. Bacterial resistance to disinfectants containing quaternary ammonium compounds. **Journal Biodeterioration and Biodegradation**, v. 41, p. 235-239, 1998.

TAYLOR, J. H.; ROGERS, B. G.; HOLAH, J. T. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20 °C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 87, n. 5, p. 718-725, 1999.

THAI, T. H.; HIRAI, T.; LAN, N. T.; YAMAGUCHI, R. Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 147-151, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TUNCAN, E. U. Effect of cold temperature on germicidal efficacy of quaternary ammonium compound, iodophor, and chlorine on *Listeria*. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 1029-1033, 1993.

VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; VELGE, P.; BOTTREAU, E.; FIEVEZ, V.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 237-248, ago. 2003.

VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas de Microbiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 239 p.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J. A.; RODRIGUES, D. P.; BACK, A. Atemporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015.

WHO. World Health Organization. ***Salmonella (non-typhoidal)***. 2016. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/> > Acesso em: dez. 2016.

YAN, S. S.; PENDRAK, M. L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J. W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S. L. An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 189-204, 2003.

ZHAO, S.; WHITE, D. G.; FRIEDMAN, S. L.; GLENN, A.; BLICKENSTAFF, K.; AYERS, S. L.; ABBOTT, J. W.; HALL-ROBINSON, E.; MCDERMOTT, P. F. Anti-microbial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6656-62, nov. 2008.

APÊNDICE A – Isolados de *S. Heidelberg*: ano de isolamento e origem

Identificação	Ano de Isolamento	Origem
01	2006	Suabe de cloaca
02	2006	Suabe de cloaca
03	2006	Suabe de arrasto
04	2006	Carçaça
05	2006	Carçaça
06	2006	Suabe de arrasto
07	2006	Suabe de arrasto
08	2006	Suabe de cloaca
09	2006	Carçaça
10	2006	Carçaça
11	2006	Suabe de cloaca
12	2006	Carçaça
13	2006	Suabe de cloaca
14	2006	Carçaça
15	2006	Carçaça
16	2006	Carçaça
17	2006	Carçaça
18	2006	Carçaça
19	2006	Suabe de cloaca
20	2006	Carçaça
21	2016	Suabe de arrasto
22	2016	Suabe de arrasto
23	2016	Suabe de arrasto
24	2016	Suabe de arrasto
25	2016	Suabe de arrasto
26	2016	Suabe de arrasto
27	2016	Suabe de arrasto
28	2016	Suabe de arrasto
29	2016	Suabe de arrasto
30	2016	Suabe de arrasto
31	2016	Suabe de arrasto
32	2016	Suabe de arrasto
33	2016	Suabe de arrasto
34	2016	Suabe de arrasto
35	2016	Suabe de arrasto
36	2016	Suabe de arrasto
37	2016	Suabe de arrasto
38	2016	Suabe de arrasto
39	2016	Suabe de arrasto
40	2016	Fezes