

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

***Salmonella sp.* EM EXCRETAS, CARCAÇAS E OVOS DE
Gallus gallus COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES DE
GOIÂNIA, GOIÁS.**

Stanislau Parreira Cardozo
Orientador: Prof. Dr. Valéria de Sá Jayme

GOIÂNIA
2019

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

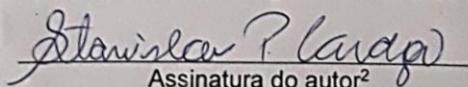
Nome completo do autor: Stanislau Parreira Cardozo

Título do trabalho: *Salmonella sp.* em excretas, carcaças e ovos de *Gallus gallus* comercializados em feiras livres de Goiânia, Goiás

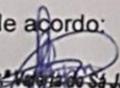
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do autor²

Ciente e de acordo:


Prof. Dr. Márcio de Sá Jayme
Assinatura do Coordenador do Curso²
MFC 5140C. 0307104

Data: 27/10/2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

STANISLAU PARREIRA CARDOZO

***Salmonella sp.* EM EXCRETAS, CARÇAÇA E OVOS DE
Gallus gallus COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES DE
GOIÂNIA, GOIÁS.**

Tese apresentada para
obtenção do grau de Doutor em
Ciência Animal da Escola de
Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás

Área de concentração:

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

Linha de pesquisa:

Epidemiologia, diagnóstico e controle de doenças infecciosas

Orientadora:

Prof. Dr. Valéria de Sá Jayme EVZ – UFG

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade EVZ – UFG

Prof. Dr. Marcos Barcelos Café EVZ – UFG

GOIÂNIA

2019

Parreira Cardozo, Stanislau
Salmonella sp. EM EXCRETAS, CARÇAÇAS E OVOS DE Gallus
gallus COMERCIALIZADOS EM FEIRAS LIVRES DE GOIÂNIA, GOIÁS
[manuscrito] / Stanislau Parreira Cardozo. - 2019.
81, LXXXI f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme; co-orientadora Dra.
Maria Auxiliadora Andrade; co-orientador Dr. Marcos Barcelos Café.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2019.
Bibliografia.

1. Avicultura. 2. Resistência aos antibióticos. 3. Salmonelose. 4.
Saúde Pública. 5. Genótipo. I. de Sá Jayme, Valéria, orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº 281 da sessão de Defesa de Tese de **Stanislau Parreira Cardozo** que confere o título de Doutor em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos**.

Aos vinte dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove, a partir das 08h30min, na sala 13 da Pós-Graduação da EVZ/UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada "**Detecção de *Salmonella* sp em amostras de excretas, carcaças e ovos de galinhas produzidas no sistema caipira comercializadas em feiras de Goiânia**". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Prof.ª Dr.ª Valeria de Sá Jayme (EVZ/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof.ª Dr.ª Iolanda Aparecida Nunes (EVZ/UFG)**, membro titular externo ao programa; **Prof.ª Dr.ª Ana Paula Iglesias Santin (EVZ/UFG)**, membro titular externo ao programa; **Próf.ª Dr.ª Michele Laboissière (UEG)**, membro titular externo; **Prof.ª Dr.ª Ísis Assis Braga (UNIFIMES)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho, conforme explicitado abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela **Prof.ª Dr.ª Valeria de Sá Jayme**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte dias do mês de dezembro de dois mil e dezenove.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Salmonella sp. em excretas, carcaças e ovos de *Gallus gallus* comercializados em feiras livres de Goiânia, Goiás.



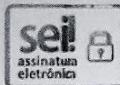
Documento assinado eletronicamente por **Valéria De Sá Jayme, Professor do Magistério Superior**, em 20/12/2019, às 13:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Iolanda Aparecida Nunes, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2019, às 13:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **MICHELE LABOISSIERE, Usuário Externo**, em 20/12/2019, às 13:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Ísis Assis Braga, Usuário Externo**, em 20/12/2019, às 14:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Iglesias Santin, Professora do Magistério Superior**, em 20/12/2019, às 14:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1065110** e o código CRC **56470DC6**.

Referência: Processo nº 23070.046326/2019-73

SEI nº 1065110

Dedico aos meus familiares, em especial a minha mãe (*in memoriam*)
Emília Parreira

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado controlando tudo para que houvesse maior aprendizado a cada dia.

A minha mãe, Emília Parreira (*in memoriam*) por todos os ensinamentos, dedicação e caráter que foram balizares para minha formação.

A minha esposa, Eliane Blanco, companheira e exemplo de dedicação e persistência, pela companhia nesta longa jornada.

Aos meus filhos, Clara Blanco e Leonardo Blanco, que cada um de sua forma vem me apoiando e exigindo o crescimento tanto como pai quanto como profissional

Ao meu irmão, Gilbson Cardoso, minhas irmãs, Hedy-Lamar Parreira e Eliana Parreira, que sempre me incentivaram a permanecer no caminho do conhecimento independente das dificuldades, demonstrando que a dedicação e o esforço sempre serão recompensados.

A Universidade Federal de Goiás, à coordenação, à secretaria e demais membros do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela formação e apoio estrutural;

Aos professores que dedicaram seu tempo ao ensino e pesquisa, em especial à Valéria de Sá Jayme, minha orientadora; à Maria Auxiliadora e ao Marcos Barcellos Café meus co-orientadores, grandes profissionais, admiráveis pessoas.

À Professora Iolanda Nunes, fundamental na realização do experimento, além de excelente professora uma boa amiga.

A toda equipe do Laboratório de Bacteriologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva; Pedro Henrique, Maria Nazaré, Maria Auxiliadora Leão, pela disposição, atenção e oportunidade de aprendizagem.

Aos demais departamentos e laboratórios que apoiaram esta pesquisa, e aos seus coordenadores e funcionários.

À CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro ao desenvolvimento do presente trabalho.

Aos amigos que me acompanham há décadas, Cleder Vicente, Marcos Shaekspeare, Cleuson Marcos, Daniel Lavinias, que sempre me deram forças para continuar independente de presença física.

Aos meus amigos mais recentes que de forma intensa têm contribuído nesta conquista, Gildomar Alves, Mariana Dallagnol, Clara Moratto, Silvânia.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS	10
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1. Galinha caipira (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	13
2.2. <i>Salmonella sp.</i>	16
2.2.1. Características gerais	16
2.2.2. Sorotipificação.....	17
2.3. Salmonelose.....	18
2.4. Epidemiologia da salmonelose	20
2.5. Resistência aos antimicrobianos	21
2.6. Aves e seus derivados.....	25
2.7. Identificação molecular	26
3. REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE <i>Salmonella sp.</i> EM AMOSTRAS DE EXCRETAS DE FRANGOS CAIPIRAS COMERCIALIZADOS EM FEIRAS DE GOIÂNIA, GOIÁS.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
2.1. Amostragem	37
2.2. Isolamento e Identificação de <i>Salmonella sp.</i>	37
2.3. Sorotipificação.....	37
2.4. Teste de Resistência aos Antimicrobianos	38
2.5. Eletroforese de Campo Pulsado - PFGE	38
2.6. Análise Estatística	38
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4. CONCLUSÃO.....	45
5. REFERÊNCIAS	46
CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE <i>Salmonella sp.</i> EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS E OVOS DE FRANGOS CAIPIRAS COMERCIALIZADOS EM FEIRAS DE GOIÂNIA, GOIÁS.	48
1. INTRODUÇÃO.....	50
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	52

2.1. Amostras.....	52
2.2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp.....	52
2.3. Sorotipificação.....	52
2.4. Teste de Resistência aos antimicrobianos	53
2.5. Eletroforese de Campo Pulsado (<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> – PFGE).....	53
2.6. Análise estatística	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4. CONCLUSÃO.....	58
5. REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO 4 - DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE <i>Salmonella</i> spp. ISOLADOS DE EXCRETAS, OVOS E CARÇAÇAS DE GALINHAS CAIPIRAS COMERCIALIZADAS EM FEIRAS DE GOIÂNIA, GOIÁS	61
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. OBJETIVOS	65
2.1. Geral	65
2.2. Específicos.....	65
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	66
3.1. Amostragem	66
3.2. Pré-enriquecimento das amostras para PCR.....	66
3.3. Extração de DNA.....	67
3.4. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR.....	67
3.4.1. Detecção do gene <i>invA</i>	67
3.4.2. Detecção do gene <i>bla</i> _{TEM}	68
3.4.3. Detecção do gene <i>qnrS</i>	68
3.4.4. Detecção do gene <i>aadA</i> ₂	68
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5. CONCLUSÃO.....	75
6. REFERÊNCIAS	76
CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS	78

RESUMO

A produção e o modo de comercialização de galinhas caipiras em feiras são importantes fatores na transmissão de infecções como a salmonelose ao ser humano. Este trabalho foi realizado com o objetivo de pesquisar a ocorrência de *Salmonella enterica* em produtos avícolas comercializados em feiras livres de Goiânia dos quais foram colhidas 100 amostras de carcaças de frangos, 100 de excretas e 50 dúzias de ovos. Foram empregadas a pesquisa bacteriológica, a sorotipificação e a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos e a análise do perfil genético dos isolados. Houve o isolamento em seis amostras das excretas; cinco das carcaças e três dos ovos. Quanto à sorotipificação foram identificados na carcaça *Salmonella* Cerro, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Corvallis além das amostras antigênicas O:4,5; O:3,10 e uma cepa rugosa; nas amostras de excretas *Salmonella* Typhimurium, S. Agona, S. Anatum e uma cepa rugosa e nas amostras de ovos *Salmonella* Corvallis. Na análise do perfil de resistência foram testados 12 antibióticos; para os isolados das carcaças dois não apresentaram resistência a nenhum antibiótico, dois a dois antibióticos, um a apenas um antibiótico e outro apresentou multirresistência às drogas; os isolados das excretas três foram sensíveis a todos os antibióticos, um isolado a apenas um antibiótico e outro com multirresistência (três antibióticos), enquanto que os três isolados dos ovos não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos testados. O resultado da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, além de confirmar a presença de *Salmonella* nas mostras positivas na bacteriologia convencional identificou ainda a presença em três amostras de excretas, duas de carcaças e três de ovos. Ainda pela PCR foi detectada a presença do gene *bla*_{TEM} em quatro amostras, o gene *qnrS* em cinco amostras e o *aadA2* em nenhuma das amostras inicialmente positivas para *Salmonella* spp. Por meio da Eletroforese em Campo Pulsado – PFGE, foi possível identificar que quatro isolados de *Salmonella* Corvallis fazem parte do mesmo grupo clonal assim como os dois de S. Anatum, enquanto que os demais sorotipos identificados pertencem a diferentes grupos clonais entre si e dos anteriormente citados. A partir destes resultados infere-se que o sistema de produção tipo caipira representa um importante papel na epidemiologia da salmonelose, mesmo com baixa ocorrência pode se apresentar como mantenedor ou disseminador de diversos sorovares de *Salmonella enterica*, indicando preocupação para a avicultura industrial e para a saúde pública.

Palavras-chave: Avicultura, resistência aos antibióticos, salmonelose, saúde pública

ABSTRACT

The production and way of selling free-range chickens in fairs are important factors in the transmission of infections such as salmonellosis to humans. This work was carried out with the aim of investigating the occurrence of *Salmonella enterica* in poultry products sold at free fairs in Goiânia from which 100 samples of chicken carcasses, 100 samples of excretes and 50 dozen eggs were collected. In this study were used bacteriological research, serotyping and determination of antimicrobial resistance profile, and analysis of the genetic profile of the isolates. There was isolation in six excrete samples; five in the carcasses and three in the eggs. Regarding serotyping, there were identified in the carcass *Salmonella* Cerro, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Rugosa, *Salmonella* Corvallis, besides the antigenic samples O:4,5; O:3,10 in the samples of excretes were identified *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Rugosa, *Salmonella* Anatum and a rough strain; and *Salmonella* Corvallis in the egg samples. In the analysis of the Resistance Profile 12 antibiotics were tested. For the isolates from the carcasses two did not present resistance to any antibiotics, two showed resistance to two antibiotics, one to just one antibiotic and another one presented multiresistance to drugs. The isolates from excretes three were sensitive to all antibiotics, one isolated to only one antibiotic and one with multiresistance (three antibiotics), while the three isolates from the eggs did not present resistance to any of the antibiotics tested. The result of polymerase chain reaction – PCR, besides confirming the presence of *Salmonella* in the positive samples from conventional bacteriology also identified the presence in three excrete samples, two carcasses and three of eggs. In addition, PCR also detected the presence of the *bla*_{TEM} gene in four samples, the *qnrS* gene in five samples and *aadA2* in any of the samples initially positive for *Salmonella* spp. Using Electrophoresis in Pulsed Field - PFGE, it was possible to identify that four *Salmonella* Corvallis isolates are part of the same clonal group as well as the two of *S. Anatum*, while the other identified serotypes belong to different clonal groups among themselves and those previously mentioned. From these results, it is inferred that the system of free-range chicken productions, represents an important role in the epidemiology of salmonellosis, either as maintainer or as a disseminator of several *Salmonella* Enterica serovars, representing a concern for industrial poultry farming and public health.

Keywords: Antibiotic resistance, poultry, public health, salmonellosis.

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

As galinhas foram introduzidas no Brasil no início do século XVI conforme relatado na carta de Pero Vaz de Caminha ao Rei de Portugal¹, dando início ao modelo de subsistência que prevaleceu até o século XX, quando os investimentos no setor avícola começaram a mudar o perfil de produção².

A criação de frangos para a produção de carne tipo caipira é um dos segmentos da avicultura alternativa que tem se mostrado promissor, pois, além de agregar valor ao produto e utilizar um sistema de criação que preza pelas normas de bem-estar animal, é adequado tanto para pequenos quanto médios produtores, havendo interesse ainda pela produção em escala comercial³.

Devido a esse cenário de desenvolvimento, desde o início do século XXI, os sistemas de produção alternativos têm sido considerados como uma opção distinta ao consumo de carne de aves, sendo direcionado especialmente a uma parcela da população que valoriza o bem-estar animal e a qualidade da proteína a ser consumida, mesmo a um custo mais elevado³.

O sistema de produção de frango caipira se utiliza de diversas práticas de manejo que são também aplicadas ao sistema de produção industrial, havendo exceções como as raças autorizadas e a alimentação que deve ser específica para este segmento. No entanto, esse sistema de produção é caracterizado pelo acesso a área aberta com baixa densidade de aves, diferenças que podem ter um papel significativo na redução da carga bacteriana assim como de resíduos de produtos químicos⁴.

Mesmo sendo criadas ao ar livre podem ser portadoras assintomáticas e reservatórios de bactérias patogênicas as quais podem ser dispersadas no ambiente por meio das excretas e serem veiculadas para outros hospedeiros animais e humanos ocasionando doenças⁵.

A criação de frangos caipiras pode ter um efeito vantajoso na redução da ocorrência de *Salmonella sp.* devido ao seu modo de produção, no entanto é necessária a implementação de um esquema de monitoramento para avaliar as tendências na ocorrência dos patógenos e para medir a eficácia das estratégias implementadas nas propriedades para reduzir sua disseminação⁶.

No entanto, poucos estudos foram direcionados para galinhas caipiras, que são expostas a múltiplas fontes de contaminação e cuja idade ao abate é maior quando

comparada como a do frango produzido no sistema intensivo. Mesmo assim demonstra-se que as medidas de biossegurança podem contribuir para a redução da contaminação por *Salmonella sp.* em aves criadas em ambientes fechados, mas para a os sistemas de criação extensivos têm sido aceita a tese de que a prevenção da transmissão ambiental é mais difícil quando comparada ao sistema intensivo⁷.

Patógenos causadores de infecção alimentar em humanos e surtos de salmonelose humana têm sido associados ao consumo de carne, ovos e produtos à base de ovos que tem resultado em problemas em saúde pública e prejuízos econômicos aos produtores em todas as fases de criação^{8,9,10}.

O uso de antimicrobianos no sistema de produção caipira geralmente ocorre sem a orientação profissional, de forma indiscriminada, o que pode contribuir para a seleção de cepas resistentes quando presentes no animal ou ainda quando veiculadas por alimentos ao homem. Neste caso há uma preocupação em saúde pública pois afeta diretamente a eficácia de antimicrobianos e pode gerar aumento na mortalidade em humanos.

Ao se considerar as peculiaridades da produção de frangos caipira e as características epidemiológicas da salmonelose, observa-se aumento da ocorrência da resistência aos antimicrobianos, assim fazem necessários mais estudos para a identificação do patógeno com o intuito de prevenção e controle não apenas para a sanidade animal, mas também para a saúde pública.

Este trabalho tem como objetivo identificar genotípica e fenotipicamente *Salmonella sp.* em amostras de excretas, carcaças e ovos de frangos caipiras comercializados em feiras livres de Goiânia, Goiás.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A história das feiras no Brasil se confunde com a de seu desenvolvimento, passando por fases de grande importância até sua marginalização e depreciação pela imprensa. Em diversas ocasiões foi cogitada a suspensão definitiva de todas as feiras livres em várias cidades brasileiras, são tidas como forma de sobrevivência para milhares de famílias e vêm resistindo ao processo de negação da rua enquanto espaço público de amplo acesso, compreendida como um lugar de encontro, de tradição popular urbana¹¹.

As feiras foram consideradas como um modelo de modernidade durante a maior parte do século XX, até que na década de 1970 esta característica começa a se tornar obsoleta com a implementação e difusão das redes de supermercados e conseqüentemente a marginalização das feiras. Desde as primeiras feiras, os produtos avícolas são comercializados e se mantém entre as preferências dos consumidores e frequentadores¹¹.

Não obstante a passagem do tempo, a feira é uma atividade econômica e social relevante para a vida de muitos brasileiros, mas, em grande parte, as dificuldades para incorporação de inovações as tem colocado em crescente desvantagem para acompanhar a evolução dos super e hipermercados¹² bem como dos serviços prestados por outros locais de comercialização. Do ponto de vista cultural, a feira livre se mantém como importante instituição que resguarda tradições, que resistem ao processo de modernização¹³. As feiras livres apresentam singularidades que as tornam um espaço de comercialização atrativo aos consumidores, por oferecerem produtos diferenciados (produzidos de maneira quase artesanal e em pequena escala) e por estreitarem relações de amizade e confiança entre vendedores e compradores¹⁴.

Todo esse conjunto de propriedades e singularidades faz da feira livre um ambiente que garante aos produtores rurais a comercialização da sua produção, que de outra forma seria difícil nesse tipo de economia de pouca liquidez e que proporciona aos consumidores a garantia de abastecimento regular, de qualidade e, em especial, adaptado aos seus hábitos alimentares. Além disso, ganham também os comerciantes locais, com a aquisição de bens de consumo por parte dos feirantes, que usam a renda proveniente de suas vendas, o que favorece a permanência do dinheiro em âmbito municipal¹⁵.

A feira também se apresenta como um meio de distribuição de produtos diferenciados, cuja produção é feita a partir de métodos “artesaniais”, o que não acontece na produção em escala feita pelos grandes proprietários, que abastecem os demais canais de comercialização. Assim, a possibilidade de encontrar produtos naturais a preços mais acessíveis pode ser um importante atrativo às feiras, o que faz da produção e

comercialização de alimentos orgânicos uma nova alternativa para manutenção e expansão das feiras-livres^{15,16}.

2.1. Galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*)

A introdução das galinhas no Brasil ocorreu no início do século XVI e foi de grande utilidade para a permanência e instalação dos colonizadores, principalmente por sua rápida adaptação às condições climáticas e disponibilidade de alimentos. Esta etapa de subsistência perdurou até final do século do XIX¹⁷.

Apenas nas primeiras décadas do século XX é que houve o início de investimento para a produção em escala, que se desenvolveu de forma significativa ao ponto de, no início do século XXI, chegar a ocupar posto de segundo maior produtor e maior exportador mundial. Quanto à comercialização dos produtos avícolas, considera-se que seu início foi em feiras nas principais cidades durante o período imperial, nas quais eram expostos apenas o excedente de produção familiar^{3,18}.

O modo de produção extensivo foi tido como uma forma mais saudável, mais próxima dos ideais de respeito e bem-estar animal, e principalmente associado a produtos mais seguros para o consumo, isto quando comparado com os animais produzidos no sistema intensivo. No entanto, nem mesmo esta forma de produção, considerada por alguns consumidores como mais saudável, é capaz de eliminar a veiculação de patógenos, principalmente a *Salmonella enterica*, causadora da salmonelose em humanos pela veiculação alimentar, quer seja pelo consumo de carnes, ovos ou seus derivados^{10,19}.

As características de rusticidade, adaptabilidade em diferentes ambientes de criação ou condições climáticas como pluviometria, incidência solar e estações do ano que podem afetar índices zootécnicos como a velocidade de crescimento, o ganho de peso e a postura, sendo estas características as mais observadas e selecionadas para esse tipo de aves¹⁹.

A tonalidade da plumagem foi selecionada posteriormente pois interfere diretamente na regulação térmica do animal, desta forma quanto maior for a temperatura local e a incidência solar, mais clara deve ser a plumagem da ave, assim como quanto mais ameno for o clima, mais escura poderá ser a plumagem devido a melhor absorção de calor¹⁰.

Mesmo com a rusticidade sendo de grande importância na escolha da raça ou linhagem a ser produzida, as galinhas caipiras estão suscetíveis a certas enfermidades

como a salmonelose e colibacilose as quais representam um risco em potencial na cadeia de transmissão para aves comerciais e homem².

No Brasil a nomenclatura e as diretrizes mínimas do sistema de produção do frango caipira foram definidas pelo Ofício Circular Nº 7, de 19 de maio de 1999 do MAPA, devendo seguir normas quanto à alimentação, que deve ser constituída por ingredientes, inclusive proteínas, exclusivamente de origem vegetal, sendo totalmente proibido o uso de promotores de crescimento de qualquer tipo ou natureza²⁰.

O sistema caipira refere-se ao sistema de produção onde as galinhas podem acessar voluntariamente áreas ao ar livre durante a maior parte de suas vidas. A legislação europeia, para esses sistemas, inclui a densidade animal, o genótipo, a composição dos alimentos e a idade ao abate, ao contrário do regulamento norte-americano que não inclui tais especificações. Ambos os regulamentos diferenciam os sistemas de criação ao ar livre em três principais: pastoreio, liberdade parcial e o tradicional caipira para o regulamento dos EUA; enquanto que para a Europa há o caipira, o *label rouge*, e totalmente livre⁶.

Nesse sistema de criação os pintainhos podem permanecer em galpões por até 25 dias, período importante para a maturação do sistema termorregulador das aves. Após este período poderão ser soltos a campo para pastoreio devendo ter, no mínimo, três metros quadrados de pasto por ave. A idade mínima para abate é de 85 dias e as linhagens devem ser provenientes de raças próprias para este fim sendo proibidas as linhagens comerciais específicas para frango de corte²⁰.

Devido ao aumento da demanda, da produção e do comércio desses produtos avícolas alternativos, a preocupação quanto à qualidade e a segurança deste produto têm aumentado, tanto para as questões de sanidade animal, quanto para as de saúde pública³.

Na Argentina, como em outros países em desenvolvimento, há uma considerável indústria de aves de quintal que, junto com grandes produtores comerciais, abastecem os mercados domésticos. Os governos adotaram um sistema para criar frangos de quintal e distribuí-los a pessoas de baixa renda, para que possam ter proteína de alta qualidade em suas dietas. Pequenos produtores têm contato limitado com veterinários e suas práticas de biossegurança são deficitárias em comparação com as da avicultura industrial. Assim, as galinhas caipiras tornam-se um possível reservatório para bactérias como as do gênero *Salmonella* que podem estar envolvidas em surtos na produção intensiva podendo ocasionar prejuízos a este sistema²¹.

A competição entre as grandes companhias produtoras de frango no sistema intensivo contribui para o desenvolvimento de novos produtos e crescimento de sistemas

de criação de frangos, ensejando maior segurança do alimento e preocupação com o bem-estar animal além de melhorias na qualidade sensorial. Desta forma, abre fronteiras para produtos avícolas diferenciados, como os caipiras²².

O consumo de produtos avícolas provenientes de sistemas de produção orgânicos ou criados ao ar livre aumentou nos últimos anos em vários países. Produtos de carne de sistemas caipira têm sido associados a um melhor sabor e altos valores nutricionais por comerciantes e consumidores, baixo teor de gordura e maiores concentrações de vitaminas e minerais em produtos cárneos. Além disso, os sistemas de produção de frangos de corte ao ar livre podem ter impacto positivo no bem-estar animal, embora a possibilidade de movimento livre das aves possa afetar o rendimento de carcaça²³.

Assim, em diversos países, como nos EUA, há um movimento de migração entre os produtores de frangos do sistema intensivo para os alternativos. Tem-se considerado que este sistema vem abordando diversos fatores de produção como o bem-estar animal, a sustentabilidade e as modificações organolépticas no produto, além da preocupação com os aspectos sanitários, pois estas aves são criadas em ambientes que não se podem ser rigorosamente controlados, ficando mais suscetíveis à contaminação por agentes patogênicos²⁴.

São uma alternativa de renda e de garantia da segurança alimentar para as famílias de pequenos produtores, destaca-se a produção de ovos, que é um alimento bastante consumido pela população brasileira, rico em aminoácidos essenciais, vitaminas (K e D), minerais e ácidos graxos. Definido pela legislação como aquele proveniente de galinhas e comercializados com casca se proveniente de outra ave, deverá conter a informação da sua espécie de origem²³.

Foram apresentados dados contraditórios quanto a identificação de *Salmonella* sp. em sistemas convencional e de criação livre, uma vez que há nos diversos sistemas, variações quanto a linhagem da ave, dieta, idade, sistema de alojamento, tempo de criação, clima e práticas de gestão, os quais podem interferir diretamente na ocorrência de surtos de salmonelose. Nos Estados Unidos, 75% dos casos são provenientes de produtos à base de ovo que ou tinham ovo como ingrediente, portanto a segurança sanitária dos ovos deve ser sempre ponderada quando se comparam os sistemas de postura²⁵.

Os frangos caipiras são de crescimento lento e podem obter nutrientes adicionais da pastagem e da forragem, são amplamente utilizados por pequenos e médios

agricultores, no entanto as infestações parasitárias estão entre os problemas mais comuns que afetam esses sistemas de criação²⁶.

Apesar de as linhagens caipiras apresentarem menor potencial de crescimento, desempenho zootécnico e rendimento de partes nobres quando comparados com os frangos de corte comerciais, sua criação é justificada por atributos diferenciados na qualidade da carne, mais próxima da exigida pelo mercado consumidor, como textura e coloração da carne mais acentuada²⁷.

O valor que os consumidores atribuem ao bem-estar dos animais é um reflexo da satisfação, segurança e conforto humanos derivados da crença de que o animal foi tratado da maneira correta, aspectos que se refletem na crescente importância que os consumidores atribuem aos critérios de compra, como rótulos de qualidade²⁸.

2.2. *Salmonella* sp.

2.2.1. Características gerais

O gênero *Salmonella* é pertencente à família *Enterobacteriaceae*, caracterizado como bacilos Gram-negativos, com medidas entre 0,7-1,5 a 2,5 µm, em sua maioria móvel com flagelos peritríquios, possuem representantes aeróbias e anaeróbias facultativas, são do grupo das mesofílicas de temperatura de crescimento ótimo próximo aos 37°C, não são esporulados, nem capsulados, sendo que a maioria não fermenta a lactose assim como D-glucose e outros carboidratos que são catabolizados com a produção de ácido e pouca produção de gás.

Composto por duas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. Esta possui seis subespécies: *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* além de possuir mais de 2.600 sorotipos, enquanto a anterior é composta por 23 sorotipos²⁹. A sorotipagem é baseada no esquema de Kaufmann-White-Le Minor, onde os antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) são identificados. Os principais sorotipos envolvidos em surtos de salmonelose humana são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium³⁰.

Dentre as características bioquímicas observa-se que é anaeróbia facultativa, não fermenta a lactose, não produz a urease, produz H₂S, consome o citrato, é positiva na prova do vermelho de metila e para o malonato é negativa^{31,29}.

Devido a sua importância, sua complexidade e diversidade há várias técnicas para o estudo de sua classificação e nomenclatura. O mais antigo e utilizado é a sorotipificação, que é um método fenotípico. No sentido de complementar e auxiliar nos

estudos epidemiológicos deste patógenos, há também os métodos que avaliam seu genoma e estes têm como inicial a reação em cadeia da polimerase por meio da amplificação do Ácido Desoxirribonucleico - DNA, que serve de base para a introdução de uma série de novos métodos para a genotipagem.

Dentre os métodos de genotipagem se destacam a Fagotipagem Definitiva (*Definitive phage type* - DT), eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), análise de repetições em múltiplos locos (MLVA), sequenciamento multi-locus (MLST), sequenciamento genômico completo (WGS), sequenciamento de Próxima Geração (NGS) e a patovariância, utilizadas para investigar a epidemiologia de *Salmonella sp.* relacionada tanto a surtos humanos quanto à contaminação em alimentos³².

É ubiqüitária e possui grande capacidade de persistência no meio ambiente, que na presença de água pode aumentar consideravelmente sobrevivendo por meses. Sorovares de *S. enterica* têm grande variedade de reservatórios e hospedeiros e podem causar agravos à saúde do consumidor. Com exceção de alguns sorovares que são hospedeiros restritos, a maioria dos sorotipos se adaptam e podem causar a salmonelose em uma variedade de hospedeiros. Em produções animais, *Salmonella* pode causar infecções clínicas ou subclínicas e inclusive assintomáticas fazendo com que os animais se tornem transmissores do agente pela eliminação nas excretas, perpetuando sua transmissão também no meio ambiente³⁰.

2.2.2. Sorotipificação

Além de subespécies, o gênero *Salmonella*, ainda é classificado em sorovares conforme critérios de tipagem estabelecidos por Kauffmann-White-Le Minor (KWL). A sorotipagem de *Salmonella sp.* tem sido uma ferramenta importante na investigação de infecções³³.

É baseada no mecanismo imunológico e tem sido usada como meio de triagem para a genotipificação, com base na identificação de antígenos somáticos específicos (O) e flagelares (H). Já foram descritos aproximadamente 90 sorovares que estão frequentemente envolvidos em casos de infecções em humanos e animais. O sorovar *Salmonella Typhimurium*, por exemplo, consegue infectar e causar doença em grande diversidade de hospedeiros como bovinos, suínos, aves e roedores³⁴.

A sorotipagem convencional tem sido um dos pilares para essas investigações, mas é demorada, requer mão de obra capacitada, grande número de reagentes e para a

diferenciação entre duas variantes de um mesmo sorotipo, testes bioquímicos adicionais são necessários^{35,36}.

2.3. Salmonelose

A contaminação de alimentos por agentes patogênicos da família *Enterobacteriaceae*, como as do gênero *Salmonella sp.*, podem provocar infecções ou intoxicações alimentares nos humanos. Estes microrganismos têm o trato gastrointestinal de animais de sangue quente ou frio, como *habitat* e sua veiculação pode ocorrer pelo consumo de alimentos contaminados. Sua ocorrência é cosmopolita e tem aumentado de forma exponencial devido ao grande consumo de produtos avícolas, incluindo ovos e produtos à base de ovos. Considera-se ainda a relação dos fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento como os ambientais e os da cadeia produtiva que permitem o desenvolvimento dos microrganismos³⁷.

A salmonelose é uma doença causada por bactérias do gênero *Salmonella* que acomete animais e humanos. Em 1874 houve um estudo sobre um surto de diarreia em que foi identificado pela primeira vez *Salmonella Typhi* e apenas em 1884 foi isolada de forma pura; após a identificação o primeiro surto de salmonelose foi confirmado laboratorialmente e descrito por 1888, no entanto foi por uma espécie de *Salmonella* Não Tifoide - NTS, então denominada de *Bacillus enteritidis*; posteriormente os pesquisadores Salmon e Smith isolaram bactéria semelhante em um surto de cólera suína que foi descrito com riqueza de detalhes e a denominaram de *Salmonella cholerasuis*³⁰.

Existem três categorias distintas utilizadas na classificação das salmoneloses, que se baseiam principalmente nas características do hospedeiro. Salmonelas altamente adaptadas ao homem incluem *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi A, B e C* (agentes da febre entérica); salmonelas adaptadas aos animais como *Salmonella Dublin* (bovinos), *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum* (aves) e finalmente as salmonelas zoonóticas, que incluem a maioria dos sorovares que acometem o homem e os animais, além de serem relacionadas às doenças de veiculação alimentar³⁸.

Em aves, a primeira descrição documentada de salmonelose foi feita no ano de 1885. Historicamente, tem-se isolado e identificado diferentes sorovares do grupo, com maior incidência *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*, como sorovares envolvidos em infecções alimentares no homem³⁹.

A salmonelose aviária provoca grandes perdas econômicas pela queda de desempenho zootécnico, além de alta morbidade e mortalidade principalmente em aves jovens. Três doenças distintas são causadas por *Salmonella sp.*, a pulorose, tendo como patógeno *Salmonella Pullorum*, o tifo aviário pela *Salmonella Gallinarum* e o paratifo aviário por qualquer outro sorovar⁴⁰.

Desta forma a sobrevivência no meio ambiente proporciona uma grande oportunidade de adaptação às condições adversas e de desenvolver mecanismos como a tolerância ao calor, como em uma colônia de *Salmonella Enteritidis* estressada pelo calor, pode-se observar o desenvolvimento de uma subpopulação que suporta melhor a adversidade da temperatura. Genotipicamente foi identificado uma ilha de resistência ao calor especificamente em um único sorotipo, que pode ter apresentado esta ilha devido à expressão gênica aumentada por seleção ao calor⁴¹.

A contaminação ambiental por salmonelas foi examinada ao longo de 12 meses em 74 lotes de poedeiras comerciais de oito fazendas no Reino Unido, que anteriormente haviam sido identificadas como positivas para *Salmonella sp.* Foram coletadas amostras de fezes, poeira, lixo, ovos e vetores, além de *swabs* de gaiolas, de comedouros, de bebedouros, de pisos, e de botas. Foram identificados diversos sorovares, no entanto o *S. Enteritidis* foi o único sorotipo persistente, havendo correlação significativa entre amostras ambientais e de fezes. Observou-se ainda que o nível de contaminação ambiental aumentou significativamente ao longo do tempo, ocorrendo ainda efeitos sazonais e de temperatura significativos sobre a contaminação⁴².

Hospedeiros de vida selvagem demonstraram ser importantes fontes de detecção de salmonelas. A eficácia da limpeza e desinfecção na contaminação residual por *Salmonella sp.* e na subsequente contaminação do lote, foi altamente variável entre e dentro das instalações. As variações entre as ocorrências detectadas ao longo do tempo e entre os rebanhos indicam a necessidade de monitoramento regular para salmonela a fim de possibilitar a segmentação de medidas de controle destinadas a eliminar a contaminação do ambiente da camada por salmonela e melhorar os procedimentos de limpeza e desinfecção⁴³.

O sistema de produção ao ar livre está se tornando mais comum em diversos países, no entanto, galinhas caipiras estão expostas a diferentes estressores em comparação aos que acometem os frangos produzidos no sistema intensivo, sugerindo que o estresse possa contribuir para o aumento da contaminação bacteriana nos ovos⁴⁴.

Considera-se ainda que a idade da galinha tem um efeito significativo no aumento do nível de contaminação bacteriana tanto na superfície da casca do ovo quanto nos poros da casca, assim como tem um efeito no escore da condição das penas. Estas observações indicam áreas que devem ser investigadas para melhorar a segurança dos alimentos e otimizar o bem-estar das galinhas criadas ao ar livre⁴⁵.

2.4. Epidemiologia da salmonelose

Existem duas espécies de *Salmonella*, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, esta compreende 22 sorotipos que estão principalmente associados a animais de sangue frio e infecções humanas são incomuns. *S. enterica* é dividida em seis subespécies (*enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*) por causa das diferenças nas características bioquímicas. A subespécie *enterica* é responsável por mais de 99% da salmonelose humana e inclui mais de 1.530 sorotipos, entre os quais *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*^{46, 47}.

Os seres humanos são os únicos suscetíveis à febre tifóide, causada por *Salmonella Typhi* e *Salmonella Paratyphi*. Os demais sorotipos de *Salmonella* são conhecidos como não-tifóide e têm os animais como principais reservatórios. *S. enterica*, subsp. *enterica*, está relacionada principalmente aos animais de sangue quente, enquanto as outras subespécies não *enterica* estão mais relacionadas aos de sangue frio, embora algumas exceções tenham sido encontradas⁴⁸.

A incidência de doenças causadas por *Salmonella* Não Tifoide varia entre os países; por exemplo, estima-se que cause 690 casos por 100.000 habitantes na Europa, enquanto em Israel, a infecção por *Salmonella* Não Tifoide é de cerca de 100 casos por 100.000 por ano^{49,50}.

Devido a sua distribuição ubíqua, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), *Salmonella* sp., é o agente bacteriano mais envolvido em casos de doenças veiculadas por alimentos (DVA's) em todo o mundo. A bactéria geralmente é transmitida ao ser humano através de alimentos de origem animal, como carne, ovos e leite^{51,52}.

No Brasil foram notificados oficialmente 16.619 surtos de DTA no período de 2000 a 2017, perfazendo um total de 2.371.438 expostos, 238.909 doentes e 183 óbitos. Os principais alimentos envolvidos nos surtos foram alimentos mistos com 11,77%, múltiplos alimentos 7,62%, ovos e produtos à base de ovos 7,31%, água 6,27%. Os principais microrganismos envolvidos nestes surtos foram *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, representando 78,5% do total. Este cenário

reforça a necessidade de monitoramento dos produtos de origem animal e em especial os avícolas devido à sua importância em saúde pública⁵³.

Tendo como base os dados do programa SalmSurv da Organização Mundial de Saúde (OMS), no período de 2001–2005, dentre os sorotipos de *Salmonella* Não Tifoide – NTS as mais comuns foram *S. Enteritidis* (65%); seguido por *S. Typhimurium* e *S. Newport*, com 12% e 4% dos isolados clínicos. Neste mesmo período *Salmonella Enteritidis* foi o sorotipo mais encontrado na Ásia, América Latina e Europa, atingindo níveis de 38%, 31% e 87% dos isolados clínicos respectivamente⁵⁴.

Verificou-se, ainda, que embora haja um aumento significativo na produção, ainda se mostra reduzido número de trabalhos que contemplam especificamente o sistema caipira e a comercialização dos produtos quanto a ocorrência de *Salmonella* sp., o uso de antibióticos e a resistência bacteriana aos antibióticos.

2.5. Resistência aos antimicrobianos

A emergência da resistência aos antibióticos tem se tornado um dos grandes desafios para a saúde mundial, especialmente quando há presença de *Salmonella* sp. O primeiro relato de *Salmonella* resistente a cloranfenicol ocorreu na década de 1960. Desde então tem sido reportado aumento da resistência em diversas partes do mundo, incluindo os Estados Unidos e o Reino Unido, a diferentes antibióticos, como as penicilinas e sulfametoxazol/trimetoprim, que são utilizados como primeira linha para o controle da salmonelose humana, assim como cepas resistentes a multidrogas (MDR)⁵⁴.

Essa resistência aos antibióticos pode ser considerada uma grande ameaça para a saúde pública principalmente por se tratar de uma zoonose e ser veiculada por produtos de origem animal, dentre os quais se destacam os avícolas. O uso de antibióticos como promotores de crescimento em aves caipiras pode ser um dos fatores que favoreceram a seleção de bactérias resistentes na microbiota intestinal das aves, que podem atingir humanos através da cadeia alimentar, implicando no resultado em falhas nos tratamentos de surtos de salmonelose com o uso de antibióticos⁵⁵.

Após a descoberta da penicilina na Inglaterra, passaram-se poucos anos para que se registrassem os primeiros casos de microrganismos resistentes a este fármaco; em 1940 foi identificada uma cepa de *Escherichia coli* produtora de β -lactamase⁵⁶. Entretanto, foi apenas durante a década de 1960 que problemas relacionados à resistência aos antimicrobianos comumente utilizados foram registrados em *Salmonella*. Os primeiros

casos de resistência antimicrobiana foram identificados no Reino Unido e, em seguida, este achado se tornou conhecido mundialmente⁴⁹.

Resistência antimicrobiana é tida como a habilidade dos microrganismos, especificamente as bactérias, em tornar-se cada vez mais resistentes a um antimicrobiano para o qual eram suscetíveis. A multirresistência aos antibióticos é uma consequência da seleção natural e da mutação genética. Cada mutação pode conferir ou passar a resistência. Este processo de seleção natural é exacerbado nos seres humanos por alguns fatores como o uso inadequado de antibióticos na medicina veterinária, falhas das condições de higiene e práticas insalubres na cadeia de produção de alimentos, facilitando a veiculação de microrganismos resistentes. Isso acentua as falhas na efetividade do uso de antimicrobianos⁵⁷.

Em 1964, ainda no Reino Unido, foi registrada a primeira cepa multirresistente de *Salmonella*. Apenas cinco anos após o relato, diversos casos de infecções foram registrados em bovinos e em humanos por uma cepa de *Salmonella* Typhimurium fagotipo DT 29, que era resistente a cinco antimicrobianos diferentes: ampicilina (AMP), estreptomicina (S), sulfonamida (SUL), tetraciclina (TET) e furazolidona (FU). Fenotipicamente, esta cepa foi denominada *Salmonella* Typhimurium DT 29 R-type ASSuTFu⁵⁸.

Como consequência, em 1969 foi recomendada e, em seguida, legalmente determinada a interrupção do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento no país. Esta medida permitiu que em 1971 não se registrasse nenhum caso de *Salmonella* Typhimurium DT 29 em bovinos e humanos, além disso, a taxa de resistência registrada em *Salmonella* foi abaixo de 3%. Contudo, entre os anos de 1975 a 1980, novos fagotipos multirresistentes (DT 204, DT 193 e DT 204c) causaram problemas em bovinos e depois em humanos. Observou-se, ainda, que estes fagotipos ampliaram sua resistência por aquisição de plasmídeos e transposons, o que dificultou o controle destas cepas, possibilitando a expansão do surto para países próximos, como Alemanha, França, Bélgica e Itália⁵⁹.

Novas cepas resistentes de *Salmonella* continuam sendo detectadas e os resultados são cada vez mais preocupantes. De um modo geral, a resistência antimicrobiana entre *Salmonella* expandiu de 20 a 30%, valores do início dos anos 90, para 70% na virada do século XX³⁸. Em alguns casos, observou-se que a resistência apresenta relação com o sorotipo e, no ano de 2000, foi identificada na Europa a cepa *Salmonella* Typhimurium DT 204b R-type ACGKSSuTTmNxC, que possui resistência a

dez antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, sulfonamida, tetraciclina, trimetoprim, ácido nalidíxico e perda de suscetibilidade ao ciprofloxacino⁵⁹.

De acordo com Pandini *et al.*,⁶⁰ a resistência antimicrobiana constitui-se um tema bastante estudado em gêneros bacterianos pela possibilidade de transmissão para o homem. Assim, é necessário um plano de ação contra a resistência bacteriana aos antibióticos, como o adotado pela União Europeia cujo enfoque é o combate à multirresistência desde junho de 2017, apoiado no conceito de Saúde Única e com objetivos de execução de boas práticas na região, melhorando a coordenação, supervisão e a adoção de medidas preventivas para o controle⁶.

Essas medidas podem desencadear ações para a implementação de pesquisas, melhorar o desenvolvimento e a inovação, além de fornecer novas soluções e ferramentas para prevenir e tratar doenças infecciosas além de melhorar o diagnóstico⁶.

Em condições adversas ocorreu a melhoria da eficiência na formação de biofilme, marcadamente quando expostas ao estresse por calor havendo o aumento da expressão de genes que codificam o mecanismo da bomba de efluxo e dos de virulência, tornando-os mais propensos a sobreviverem sob as tensões de processamento e aumentar a patogenicidade⁶¹.

Esses patógenos desenvolveram tolerância ao calor e a formação de biofilme sob condições estressantes, aumento da expressão de genes de efluxo e de virulência assim como melhor capacidade de sobrevivência às tensões de processamento e se tornarem efetivamente causadores de doenças⁶².

Alguns isolados podem ser mais propensos a resistir às estratégias de controle no processamento devido às características intrínsecas. Por exemplo, *Salmonella* Senftenberg 775W é extremamente resistente ao calor, o que resultaria em melhor sobrevivência em caso de tratamento térmico inadequado ou falhas durante o processamento. Além disso, a tolerância ao ácido varia consideravelmente entre *S. enterica*, o que poderia afetar a eficácia de alguns antimicrobianos. *S. enterica* tem habilidades distintas para formar biofilme que fornece proteção às bactérias contra estresses mecânicos, calor, desinfetantes e dessecação⁶³.

Um dos mecanismos de resistência aos antibióticos utilizados pelas bactéria é o das bombas de efluxo que além de conferirem resistência aos antibióticos são importantes na patogenicidade bacteriana, pois exportam, inclusive, agentes antimicrobianos

derivados do hospedeiro e, assim, permitem que as bactérias colonizem e sobrevivam em certos nichos hostis dos hospedeiros⁶⁴.

Nove dessas bombas foram identificadas em *Salmonella sp.*, duas pertencem ao facilitador principal (MFS) (EmrAB e MdfA), uma à extrusão de compostos múltiplos e tóxicos (MATE) (MdtK), uma ao efluxo de cassete de ligação a ATP (ABC) (MacAB) e cinco à família de transportadores de resistência-nodulação-divisão (RND) (AcrAB, AcrD, AcrEF, MdtABC, MdsABC)⁶⁵.

Duas bombas (MdfA e MdtK) abrangem a membrana citoplasmática, enquanto os outros sete transportadores são sistemas multicomponentes que abrangem a membrana interna e externa. Com exceção do MdsAB, que é capaz de usar o MdsC, todas as bombas do sistema multicomponente requerem o *tolC* como canal de membrana externa para sua função assim como para a sobrevivência em ambientes nocivos, embora não haja informações sobre sua função na sobrevivência no albúmen⁶⁵.

Ao se considerar as compensações evolutivas ocasionadas pela adaptação às condições de estresse pode-se observar que se constituem uma estratégia de adaptação ao uso de antimicrobianos. Para superar essas estratégias e evitar a resistência aos medicamentos é necessário que se realize a prescrição de uso sequencial de drogas, o que tende a superar a evolução da resistência ao uso do primeiro e induz a sensibilidade aos próximos, permitindo identificar a sensibilidade ou a resistência colateral⁶⁶.

A sensibilidade colateral ocorre quando o uso do primeiro medicamento induz sensibilidade ao segundo. Por outro lado, quando o primeiro medicamento induz resistência aumentada, no segundo considera-se que houve a resistência colateral (ou cruzada). Ela permite ainda identificar pares de fármacos ou sequências exibindo sensibilidade ou resistência colateral⁶⁶.

O protocolo chave é o cultivo de uma população em concentrações crescentes de um fármaco para induzir resistência, e depois analisar a susceptibilidade da população resultante a um painel de potenciais terapias de segunda linha. A partir desses experimentos, sequências ou ciclos de fármacos nos quais cada um induz sensibilidade colateral na próxima, foram sugeridos como potenciais estratégias para ampliar a eficácia terapêutica de um conjunto limitado de fármacos⁶⁶.

2.6. Aves e seus derivados

Os ovos são parte do ciclo reprodutivo das galinhas e têm como função apoiar o desenvolvimento do embrião por 21 dias. Conseqüentemente, os ovos são providos de nutrientes essenciais para esse processo de maturação, além dos mecanismos físicos e químicos de defesa que limitam a invasão e multiplicação microbiana. No entanto, *Salmonella Enteritidis* desenvolveu a capacidade de contaminar os ovos e, assim, causar infecções em humanos por meio do consumo de produtos contaminados⁶⁷.

Uma das principais rotas de contaminação de ovos por *Salmonella Enteritidis* é a colonização do trato reprodutivo da galinha em que o oviduto superior é o principal local de colonização e a maioria das bactérias são depositadas no interior do albúmen do ovo ou nas membranas da casca do ovo. Uma vez depositada no albúmen, as bactérias precisam utilizar os mecanismos de escape aos diversos componentes antimicrobianos, incluindo lisozima, ovotransferrina, defensinas e cistatina por cerca de 20 a 26 h, durante o período em que a casca é formada ao redor do albúmen, na temperatura corporal da galinha de 42 °C⁶⁸.

O promotor de *tolC* é ativado após o contato com o albúmen em que uma cepa de deleção de *tolC* tem capacidade de sobrevivência diminuída nesta matriz na qual a ovotransferrina é o fator antimicrobiano que além de ativar o promotor *tolC*, inibe o crescimento da cepa de deleção de *tolC* demonstrando que as bombas RND são dependentes de *tolC* estando envolvidas na neutralização dos efeitos bactericidas da ovotransferrina⁶⁹.

A ovotransferrina, segunda maior proteína do albúmen, representa cerca de 13% do total das proteínas, consiste em dois subdomínios, capazes de ligar dois íons de ferro, o que limita a quantidade de ferro livre e, conseqüentemente, inibe o crescimento bacteriano⁷⁰.

Em resposta à deficiência de ferro, *Salmonella enterica* segrega uma variedade de quelantes de ferro poderosos e seletivos, chamados sideróforos, como a enterobactina e a salmochelina. Enquanto o transportador de membrana externa para salmochelina ainda precisa ser identificado, mesmo que se conheça o a importância do *tolC* formando o canal da membrana externa que carrega a enterobactina⁶⁸.

2.7. Identificação molecular

A Eletroforese em gel de campo pulsado - PFGE, foi descrita em 1984 e desenvolvida como um método de subtipagem para *Salmonella*. É o padrão ouro para PulseNet International, e tem sido usado por autoridades de saúde pública e reguladores de alimentos para investigações de surtos e rastreamento de fontes de infecção^{71,72}. É uma importante ferramenta auxiliar no controle e investigação de surtos de *Salmonella* pois permite avaliar a relação filogenética de *Salmonella* entre o ser humano e a fonte de origem, com certa limitação⁷³.

A PFGE tem alta concordância com a relação epidemiológica após duas décadas de acumulo de dados. No entanto, o banco de dados PulseNet para padrões PFGE não está disponível ao público e só pode ser acessado pelos laboratórios participantes da rede *PulseNet*. A técnica baseia-se no uso enzimas de restrição que reconhecem locais específicos de restrição ao longo da cadeia do DNA genômico e o fragmenta para tamanhos variando de 20 a 800 kb (até 2.000 kb)⁷¹.

Estes fragmentos são separados em gel de agarose, mudando constantemente a direção da corrente elétrica (campo pulsado), gerando um "padrão de impressão digital" específico para um determinado isolado. As enzimas de restrição XbaI, NotI, SpeI e SfiI têm sido tipicamente usadas para bactérias gram-negativas, no entanto a XbaI especificamente para *Salmonella*.

Sorovares polifáticos são derivados de mais de um ancestral evolutivo comum ou grupo ancestral (por exemplo, sorovares *Salmonella* Newport, S. Mississippi, S. Saintpaul, S. Kentucky), mostram altos níveis de diversidade de pulsotipos. A PFGE pode agrupar isolados epidemiologicamente não relacionados em pulsotipos idênticos, assim como definir pulsotipos similares para sorovares distintos, mas muito semelhantes geneticamente ao ancestral comum⁷¹.

3. REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Cultura. Carta de Pero Vaz de Caminha 1500. 1–14 (2019).
2. Lopes JCO. Técnico em Agropecuária - Avicultura. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2010; 94p.
3. Delgado GC, Bergamasco SMPP. Agricultura familiar brasileira: desafios e perspectivas de futuro. Brasília: Ministério do Desenvolvimento Agrário; 2017. 470p.
4. Omeira N, Barbour EK, Nehme PA, Hamdeh SK, Zurayk R, Bashour I. Microbiological and chemical properties of litter from different chicken types and production systems. *Sci. Total Environ.* 2006; 367(1): 156–162.
5. Ojo OE, Ogunyinka OG, Agbaje M, Okuboye JO, Kehinde OO, Oyekunle MA. Antibioqram of Enterobacteriaceae isolated from free-range chickens in Abeokuta, Nigeria. *Vet. Arh.* 2012; 82(6): 577–589.
6. European Food Sanitary Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J.* 2018; 16(2):e05182.
7. Esteban JI, Oporto B, Aduriz G, Juste R A, Hurtado A. A survey of food-borne pathogens in free-range poultry farms. 2008; 123(1-2): 177–182.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde; 2011.
9. Swaggerty CL, Genovese KJ, He H, Byrd JA, Kogut MH. Mechanisms of persistence, survival, and transmission of bacterial foodborne pathogens in production animals. *Front. Vet. Sci.* 2018; 5: 139.
10. Barbosa FJV, Nascimento MPSB, Mendonça FD, Nascimento HTS, Araújo Neto RB. Sistema alternativo de criação de galinhas caipiras. Embrapa Meio Norte de Produção. 2007.
11. Mascarenhas G, Dolzani MC. Feira livre: Territorialidade popular e cultura na metrópole contemporânea. *Ateliê Geográfico.* 2008; 2(2):72–87.
12. Sato L. Processos cotidianos de organização do trabalho na feira livre. *Psicol. e Soc.* 2007; 1(1):95–102.
13. Protássio SFC. Tipagem Molecular em estirpes de *Brucella* spp. [Tese]. Lisboa: Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2008.
14. Grimm IJ, Sampaio CC, Procopick M. Encadeamento ecossocioeconômico e gestão urbana: um estudo das feiras livres na cidade de Curitiba (PR). *Novos Cad. NAEA.* 2018; 21(1):35–56.

15. Morel APS, Rezende VT, Sette RS. Negócio feira livre: análise e discussão sob a perspectiva do feirante. *Extensão Rural*. 2015; 22(4):43–57.
16. Bitencourt BLG, Lima PGC, Barros FB. Comércio e uso de plantas e animais de importância mágico-religiosa e medicinal no mercado público do Guamá, Belém do Pará. *Rev. FSA*. 2014; 11(3):96–158. doi:10.12819/2014.11.3.5
17. Guimarães HK. Análise de prevalência de salmonelose em criações não tecnificadas de *Gallus gallus* no Distrito Federal.[Dissertação]. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária; 2006.
18. Sakomura NK. Histórico e evolução da avicultura no Brasil. *Unesp*. 2014; 1–17.
19. Zen S, Iguna MD, Ortelan CB, Santos VHS, Felli CB. Evolução da avicultura no Brasil, mercado internacional. *Inf. Cepea*. 2015; 1–3.
20. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular N° 7 de maio de 1999, que dispõe sobre o Registro do produto "Frango Caipira ou Frango Colonial" ou "Frango Tipo ou Estilo Caipira" ou "Tipo ou Estilo Colonial". 1999.
21. Rodríguez FI, Pascal DC, Pulido D, Osinalde JM, Caffer MI, Bueno, DJ. Prevalence, antimicrobial resistance profile and comparison of selective plating media for the isolation of *Salmonella* in backyard chickens from Entre Rios, Argentina. *Zoonoses Public Health*. 2018; 65:95–101.
22. Silva DCF, Arruda AMV, Gonçalves AA. Quality characteristics of broiler chicken meat from free-range and industrial poultry system for the consumers. *J. Food Sci. Technol*. 2017; 54(7):1818–1826.
23. Martínez-Pérez M, Sarmiento-Franco L, Santos-Ricalde RH, Sandoval-Castro CA. Poultry meat production in free-range systems: Perspectives for tropical areas. *Worlds. Poult. Sci. J*. 2017; 73(2):309–320.
24. Welshans K. Study delves into free-range poultry productions aspects. *Fedstuffs*. 2018; 8.
25. Galvão JA, Biondo AW, Possebon FS, Spina TL, Correia LB, Zuim CV, Guerra Filho JB, Pantoja JC, Pinto JP. Microbiological vulnerability of eggs and environmental conditions in conventional and free-range housing systems. *Semin. Agrar*. 2018; 39:133–142.
26. Welshans, K. Study delves into free-range poultry productions aspects. *Feedstuffs* 2018; 8.
27. Rossa LS, Stertz SC, Macedo REF. Regulamentação, mercado e qualidade da carne de frango orgânico no Brasil – Revisão. *Rev. Acadêmica Ciência Anim*. 2012; 10:29-44.
28. Morais J, Ferreira PB, Jacome IM, Mell R, Breda FC, Rorato PR. Curva de

- crescimento de diferentes linhagens de frango de corte caipira. *Ciência Rural*. 2015; 45(10):1872–1878.
29. Shivakumaraswamy SK, Deekshit VK, Vittal R, Akila DS, Mundanda DM, Raj JR, Chakraborty A, Karunasagar I. Phenotypic & genotypic study of antimicrobial profile of bacteria isolates from environmental samples. *Indian J. Med. Res.* 2019; 149(2):1–8.
 30. Jajere SM. A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and adaptation and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Vet. World.* 2019; 12(4):504–521.
 31. Alzwghaibi AB, Yahyaraeyat R, Fasaai BN, Langeroudi AG, Salehi TZ. Rapid molecular identification and differentiation of common *Salmonella* serovars isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay. *Arch. Microbiol.* 2018; 200:1009–1016.
 32. Shi C, Singh P, Ranieri ML, Wiedmann M, Switt AIM. Molecular methods for serovar determination of *Salmonella*. *Crit. Rev. Microbiol.* 2015; 41(3):309–325.
 33. Gao R, Wang L, Ogunremi D. Virulence determinants of Non-typhoidal Salmonellae. *IntechOpen.* 2016; 13.
 34. Zhao X, Gao Y, Ye C, Yang L, Wang T, Chang W. Prevalence and characteristics of *Salmonella* isolated from free-range chickens in Shandong province, China. *Biomed Res. Int.* 2016; 2016:1-6.
 35. Lopez-Canovas L, Martinez Benitez MB, Herrera Isidron JÁ, Flores Soto E. Pulsed Field Gel Electrophoresis: Past, present, and future. *Anal. Biochem.* 2019; 573:17–29.
 36. Gand M, Matheus W, Saltykova A, Roosens N, Dierick K, Marchal K, Keermaecker SCD, Bertrand S. Development of a real-time PCR method for the genosertotyping of *Salmonella* Paratyphi B variant Java. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019; 103(12):4987–4996.
 37. Crabb HK, Gilkerson JR, Browning GF. Does only the age of the hen matter in *Salmonella enterica* contamination of eggs? *Food Microbiol.* 2019; 77:1–9.
 38. Heredia N, García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Anim. Nutr.* 2018; 4(3):250–255.
 39. Yeh H, Kojima K, Mobley JA. Veterinary immunology and immunopathology epitope mapping of *Salmonella* flagellar hook-associated protein, FlgK, with mass spectrometry-based immuno-capture proteomics using chicken (*Gallus gallus domesticus*) sera. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2018; 201:20–25.
 40. Hesse M, Weber R, Glünder G. Antibody titers in turkeys increase after multiple booster vaccinations with an attenuated *Salmonella* live vaccine. *BMC Res.* 2018; 11:367.

41. Gieraltowski L, Higa J, Peralta V, Green A, Schwensohn C, Rosen H, Libby T, Kissler B, Marsden-Haug N, Booth H Kimura A. National outbreak of multidrug resistant *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry company. *PLoS One*. 2016;11(9):1–14.
42. Chousalkar K, Gole V, Caraguel C, Rault JL. Chasing *Salmonella* Typhimurium in free range egg production system. *Vet. Microbiol*. 2016;192:67–72.
43. Wales A, Breslin M, Carter B, Sayers R, Davies R. A longitudinal study of environmental salmonella contamination in caged and free-range layer flocks. *Avian Pathol*. 2017;36(3):187-97.
44. Gole VC, Woodhouse R, Caraguel C, Moyle T, Rault JL, Sexton M, Chousalkar K. Dynamics of *Salmonella* shedding and production systems. *Appl. Environ. Microbiol*. 2017; 83(5):3313–16.
45. Moyle T, Drake K, Gole V, Chousalkar K, Hazel S. Bacterial contamination of eggs and behaviour of poultry flocks in the free range environment. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 2016;49:88–94.
46. Astolfi-Ferreira CS, Pequini MRS, Nuñez LFN, Parra SHS, Chacon R, Torre DID, Pedrosa AC, Ferreira AJP. A comparative survey between non-systemic *Salmonella* spp. (paratyphoid group) and systemic *Salmonella* Pullorum and *S. Gallinarum* with a focus on virulence genes. *Pesqui. Vet. Bras*. 2017;37:1064–1068.
47. Abdeen E, Mousa WS. Antibigram and genetic diversity of *Salmonella enterica* with zoonotic potential isolated from morbid native chickens and pigeons in Egypt. *J. Appl. Microbiol*. 2019;124:1–19.
48. Mogollón Vergara D, Rodríguez Gutiérrez V, Verjan García N. Prevalence and molecular identification of *Salmonella* spp. isolated from commercialized eggs at Ibagué, Colombia. *Rev. Salud Anim*. 2016;38:164–172.
49. Yin M, Yang B, Wu Y, Wang L, Wu H, Zhang T, Tuohetaribayi G. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* serovar in retail meats in market place in Uighur, Xinjiang, China. *Food Control*. 2016;64:165–172.
50. Nair DV, Johny A. Food Safety in Poultry Meat Production. *Food Saf*. 2019;. doi:10.1007/978-3-030-05011-5
51. Wolschick J, Bosco SMD. Prevalence of *Salmonella* spp. in chicken shell eggs produced and commercialized in Rio Grande do Sul. *Rev. Destaques Acadêmicos*. 2015;7:182–187.
52. Nolan T. *A Technical Guide - PCR Technologies*. Boca Raton; CRC pRESS. 2014; 188p..
53. São Paulo. Secretaria Estadual de Saúde. *Invetigação epidemiológica de surtos*:

- Método epidemiológico de investigação e sistema de informação material. vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos. São Paulo: SES; 2006; 47p.
54. Eng SK, Pusparajah P, Mutalib NSA, Ser HL, Chan KG, Lee LH. *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Front. Life Sci.* 2015;8(3):284–293.
 55. Gottapu GC, Suresh B. Multidrug resistance and ESBL profile of *Salmonella* serovars isolated from poultry birds and foods of animal origin. *Pharma Innov. J.* 2019;8:277–282.
 56. Hoelzer K, Wong N, Thomas J, Talkington K, Jungman E, Coukell A. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Vet. Res.* 2017;13(1):211-247.
 57. Mund M D, Khan UH, Tahir U, Mustafa BE, Fayyaz A. Antimicrobial drug residues in poultry products and implications on public health: A review. *Int. J. Food Prop.* 2017;20(7):1433–1446.
 58. Ghilardi, ACR, Tavechio AT, Fernandes SA. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* . 3006;101(3):281–6.
 59. Branchu P, Bawn M, Kingsley RA. Genome variation and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathovariants. *Infeccion Immun.* 2018;86(8):79–88.
 60. Pandini JA, Pinto FGS, Muller JM, Weber LD, Moura, AC. Ocorrência e perfil de resistencia antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* 2015;82:1–6.
 61. Etter AJ, West AM, Burnett JL, Wu ST, Veenhuizen DR, Ogas RA, Oliver HF. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Heidelberg Food Enhanced Stress Tolerance Capabilities. 2019;85(16):1–22.
 62. Rocchi L, Paolotti L, Rosati A, Boggia A, Castellini C. Assessing the sustainability of different poultry production systems: A multicriteria approach. *J. Clean. Prod.* 2019;211:103–114.
 63. Rahn K, Grandis AS, Clarck RC, McEwen AS, Galan JE, Ginocchio C, Curtiss IR, Gyles CR. Amplification of *invA* gene of *Salmonella* by Polymerase Chain Reaction (PCR) as a specific method for detection of Salmonellae. *JMolecular Cell.*1992;6:271–279.
 64. Mendonça EP. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. [Tese]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária:2016.

65. Buchala FG, Ishizuka MM, Mathias LA, Berchieri Junior A, Castro AG, Cardoso AL, Tessari EM, Kanaschiro AM. Ocorrência da reação sorológica contra *Salmonella Pullorum* em aves de ‘fundo de quintal’ do estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* 2006;73:1–5.
66. Nichol D, Rutter J, Bryant C, Hujer AM, Lek S, Adams MD, Jeavons P, Anderson AR, Bonomo RA, Scott JG. Antibiotic collateral sensitivity is contingent on the repeatability of evolution. *Nat. Commun.* 2019;10(1):334.
67. Schmidt A, Mack G, Möhring A, Mann S, Benni N. El. Stricter cross-compliance standards in Switzerland: Economic and environmental impacts at farm- and sector-level. *Agric. Syst.* 2019;176:102664.
68. Del Castillo-Rueda A, Khosravi-Shahi P. Papel del hierro en la interacción entre el huésped y el patógeno. *Med. Clin. (Barc).* 2010;134(10):452–6.
69. Moraes DMC, Duarte SC, Bastos TS, Rezende CL, Leandro NS, Café MB, Stringhini JH, Andrade MA. Detection of *Salmonella* spp. by conventional bacteriology and by quantitative polymerase-chain reaction in commercial egg structures. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 2016;18(1):117–124.
70. Moraes DMC. Investigação bacteriológica e molecular de *Salmonella* sp. em granjas de postura comercial. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2014.
71. Tang S, Orsi RH, Luo H, Ge C, Zhang G, Baker RC, Stevenson A, Wiedmann M. Assessment and comparison of molecular subtyping and characterization methods for *Salmonella*. *Front. Microbiol.* 2019;10:1591.
72. Ambrose J, Ireng LM, Durant JF, Bearzatto B, Bwire G, Stine OC, Gala JL. Backward compatibility of whole genome sequencing data with MLVA typing using a new MLVAtype shiny application: the example of *Vibrio cholerae*. *PlosOne.* 2019;14:12. doi:10.1101/663138
73. Phongaran D, Khang-Air S, Angkititrakul S. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from broilers and pigs in Thailand. *Vet. World.* 2019;12:1311–1318.

CAPÍTULO 2 - IDENTIFICAÇÃO GENOTÍPICA E FENOTÍPICA DE *Salmonella* sp. EM AMOSTRAS DE EXCRETAS DE FRANGOS CAIPIRAS COMERCIALIZADOS EM FEIRAS DE GOIÂNIA, GOIÁS.

RESUMO

Frangos caipiras vivos historicamente são comercializados em feiras livres no Brasil, constituindo importante fonte de renda para pequenos produtores agropecuários e complementando a renda de milhares de brasileiros. No entanto, podem veicular patógenos como *Salmonella* sp. aos seres humanos e ao plantel avícola nacional. O objetivo deste trabalho foi proceder a detecção de *Salmonella* sp. em cem amostras de excretas de frangos caipiras comercializados nas feiras livres de Goiânia, Goiás. Pela técnica bacteriológica convencional foram obtidos cinco isolados (5%) que foram submetidos ao teste de susceptibilidade aos antimicrobianos sendo verificada a resistência em 2/5 à fosfomicina e 1/5 ao ceftiofur e à enrofloxacina. Não foi observada nenhuma amostra resistente à norfloxacina, amoxicilina, sulfonamida, tetraciclina cloranfenicol, aztreonam, ciprofloxacina e para a associação entre sulfonamida e trimetoprim. Foram identificados os sorovares S. Agona (01), S. Typhimurium (01), S. Anatun (02) e uma cepa rugosa. Foi realizado o teste de Eletroforese em Campo Pulsado e identificados diferentes grupos clonais para os pulsotipos de S. Agona, S. Anatun, que se diferiram dos pulsotipos de S. Anatun que entre si pertencem ao mesmo grupo clonal. Detectou-se a circulação de *Salmonella* sp. em excretas de galinhas caipiras comercializadas nas feiras livres de Goiânia, assim como a confirmação de resistência a alguns antimicrobianos e uma variedade de pulsotipos. Estas informações são importantes subsídios para a análise de risco, tanto para sanidade avícola quanto para saúde pública.

Palavras-chave: Avicultura, resistência bacteriana, salmonelose.

ABSTRACT

Free-range chickens are historically sold at fairs in Brazil, constituting an important source of income for small agricultural producers and complementing the income of thousands of Brazilians. However, they can transmit pathogens such as *Salmonella* sp. to humans and the national poultry squad. The objective of this work was to detect *Salmonella* sp. in one hundred samples of excretes of free-range chickens sold at fairs of Goiânia, Goiás. By conventional bacteriological technique, five isolates (5%) were obtained and submitted to antimicrobial susceptibility test. Resistance was verified in 2/5 to phosphomycin and 1/5 to ceftiofur and enrofloxacin and no sample showed resistance to norfloxacin, amoxicillin, sulfonamide, tetracycline chloramphenicol, aztreonam, ciprofloxacin and for the association between sulfonamide and trimethoprim. Serovars *S. Agona* (01), *S. Typhimurium* (01), *S. Anatun* (02) and a rough strain were identified. The Pulsed Field Electrophoresis test was performed and different clonal groups were identified for the *S. Agona*, *S. Anatun* pulsotypes, which differed from the *S. Anatun* pulsotypes that belong to the same clonal group. It was detected *Salmonella* sp. circulation in feces of free-range chickens sold at fairs in Goiânia, Goiás, as well as confirmation of antimicrobial resistance and a variety of pulsotypes. This information's are important subsidies for risk analysis, both for poultry and for public health.

Keywords: Poultry, bacterial resistance, salmonellosis.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil a feira livre constitui uma modalidade de mercado varejista ao ar livre, de periodicidade semanal, organizada como serviço de utilidade pública pela municipalidade e voltada para a distribuição local de gêneros alimentícios e produtos básicos provenientes de diversas regiões¹, sendo o frango caipira é um dos produtos comercializados².

A produção caipira se caracteriza pela exploração extensiva, com a utilização de poucos controles sanitários assim como de práticas de manejo específicas, predominante na agricultura familiar, geralmente com baixa viabilidade econômica, em sua maioria de subsistência familiar³.

Nessa forma de produção é possível a ocorrência de diversos patógenos, entre eles *Salmonella* sp. que possui vasta distribuição na natureza, tendo o trato intestinal dos animais e do homem como principal reservatório, sendo que os animais domésticos e selvagens são tidos como portadores inaparentes. Os animais de vida livre têm maior importância como reservatórios, sendo um risco de infecção para humanos e outros animais, inclusive os de criação⁴.

Causador da salmonelose, este patógeno tem ampla distribuição e ocorrência em diferentes regiões do Brasil. O principal sorotipo identificado em surtos de origem alimentar envolvendo produtos avícolas, *Salmonella* Enteritidis, por isso se tem a necessidade de controle da sua presença em alimentos, principalmente os de origem animal, como os produtos cárneos⁵.

Além de causar enfermidade, *Salmonella enterica* está associada também à resistência bacteriana aos antimicrobianos, uma vez que podem veicular essa característica ao ser humano por meio dos produtos avícolas.

Embora se tenha diversas técnicas para a identificação de *Salmonella* com excelente precisão e reconhecidamente sensíveis e específicas, como a sorotipagem, há necessidade de se utilizar técnicas complementares para o estudo epidemiológicos como a Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE), possibilitando identificar suas fontes físicas, suas relações biológicas, e sua rota de transmissão assim como a dispersão dos genes responsáveis por sua virulência e resistência a medicamentos⁶.

Desta forma, considerando a importância de *Salmonella* sp., na saúde pública e sua veiculação por meio de alimentos propôs-se o desenvolvimento deste trabalho com o

objetivo de pesquisar *Salmonella sp.* em excretas de frangos caipiras comercializados nas feiras livres de Goiânia, GO.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem

Foram colhidas 100 amostras de excretas frescas de frangos caipiras expostos à venda, definidas por conveniência e ao acaso; haviam galinhas vivas expostas em 29 feiras do município de Goiânia, para identificação destas feiras foram visitadas 118 em Goiânia. A colheita foi realizada nos horários de funcionamento das respectivas feiras (período matutino, vespertino ou noturno), em todos os dias da semana no período de setembro de 2017 a setembro de 2018.

Foram colhidas excretas frescas presentes nas gaiolas ou recipientes em que as aves eram expostas para o comércio, utilizando-se colheres descartáveis estéreis. Imediatamente após a colheita foram acondicionadas em embalagens plásticas estéreis tipo *stomacher* e acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Goiás.

2.2. Isolamento e Identificação de *Salmonella* sp.

As amostras foram submetidas à pesquisa convencional de *Salmonella* sp. seguindo o protocolo definido pela Instrução Normativa SDA Nº 62, de 26 de agosto de 2003 com adaptações. Foi adequado o volume de água peptonada tamponada (APT) a 1% ao peso da amostra coletada, uma vez que não foi possível obter e colher 25 gramas de excreta, preconizadas na literatura em todas as colheitas. As amostras foram pesadas e calculado o volume de APT, permanecendo a proporção de 1:10 de excretas em relação a APT.

A série bioquímica confirmatória consistiu em submeter culturas em ágar TSI às provas de Urease, SIM, Vermelho de Metila, Citrato de Simons, Malonato, Lisina. Os isolados confirmados bioquimicamente como *Salmonella* sp., foram estocadas em triplicata e mantidas sob refrigeração em ágar nutriente.

2.3. Sorotipificação

Os isolados de *Salmonella enterica* foram enviados ao Laboratório de Referência Nacional para Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ, para a identificação por meio do teste sorológico conforme descrito por Kauffman-White-Le Minor.

2.4. Teste de Resistência aos Antimicrobianos

Para a realização do teste de resistência aos antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em ágar com discos de antimicrobianos em meio Muller Hinton, conforme descrito pelo CLSI 2017⁷. Como padrão foi utilizada a cepa de referência para *Salmonella* Enteritidis ATCC 14028.

Os antimicrobianos testados foram amoxicilina 10µg (AMO), aztreonam 30µg (AZT), ceftiofur 30µg (CEF), ciprofloxacina 5µg (CIP), cloranfenicol 30µg (CLO), enrofloxacina (ENO), fosfomicina 200µg (FOS), gentamicina 10µg (GEN), norfloxacina 10µg (NOR), sulfonamida 300µg (SUL), sulfonamida com trimetoprim 25µg (SUT) e tetraciclina 30µg (TET). A leitura dos halos de inibição e a classificação quanto ao halo de inibição foi realizada conforme definido pelo CLSI (2017)⁷.

2.5. Eletroforese de Campo Pulsado - PFGE

A Eletroforese de Campo Pulsado - PFGE foi realizada no Laboratório de Referência Nacional para Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde do Brasil. Foram enviadas ao laboratório amostras estocadas em ágar nutriente.

O teste foi realizado de acordo com o protocolo do Centro de Controle de Doenças (CDC)⁸. O método de tipagem molecular pela PFGE foi realizado com a digestão pela enzima XbaI sendo que os padrões de similaridade dos pulsotipos foram analisados e comparados entre si usando coeficiente de DICE⁹ por meio do *Gel Compare II Software* (Matemática Aplicada)¹⁰.

2.6. Análise Estatística

Para interpretação dos resultados encontrados, foi realizada estatística descritiva através da frequência dos dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das cem amostras de excretas analisadas pela técnica bacteriológica convencional 5% (5/100) foram positivas para *Salmonella sp.* Quanto à identificação sorológica foram obtidos os sorovares, *Salmonella Agona*, *S. Anatum*, *S. Typhimurium* e uma cepa rugosa.

Nas amostras colhidas das 29 feiras, que haviam frangos vivos expostos ao comércio, verificou-se positividade em 16,67% (4/29) das feiras livres de Goiânia.

O isolamento de *Salmonella enterica* em excretas de galinhas caipiras pode estar relacionado com o modo de criação, haja vista que estas aves têm acesso a diversas fontes de infecção como excretas de aves silvestres, contato com animais sinantrópicos e silvestres que são relacionados à transmissão do agente para diversas espécies animais¹¹.

Outros fatores a serem considerados são os geradores de estresse nestas aves, uma vez que o ambiente aberto tem sido associado ao estresse pois deixam as aves susceptíveis ao ataque de predadores e expostas às intempéries da natureza como insolação e chuvas, o que pode ocasionar uma baixa no sistema imunológico, facilitando a instalação da bactéria¹².

O isolamento de *Salmonella enterica* pode ser utilizado como indicativo da característica de reservatório e disseminadoras ambientais do patógeno, assim como sua presença no organismo animal além da infecção intestinal pode ocorrer tanto em vísceras comestíveis como no sistema reprodutor, que pode contaminar ovos pela via transovariana¹³.

A presença de diferentes sorovares isolados das excretas, sugere uma alta capacidade de sobrevivência e contaminação ambiental sendo que esta habilidade foi observada também por Alegria-Morain et al.⁷, quando detectaram, na região central do Chile, o percentual de 2,33% de positividade para *Salmonella enterica*, analisando 1461 amostras de excretas de frangos caipiras produzidos em 15 províncias no período de julho de 2013 a abril de 2015. Assim como os resultados obtidos por Clothier et al.⁷, em trabalho realizado na Califórnia, Estados Unidos, identificou a ocorrência de 1,7% de *Salmonella enterica* em 2.521 amostras de excretas de aves oriundas de três estados norte-americanos colhidas no período de 2012 a 2015, apontam para tal condição de sobrevivência e diversidade dos sorovares no ambiente.

Por outro lado quando se restringe a diversidade de locais amostrados pode-se observar uma ocorrência superior como nos trabalhos realizados por Ojo et al.⁹, que colheram 153 amostras de excretas em uma única província na Nigéria no período de

outubro de 2008 a julho de 2010 e obtiveram 10,87% de positividade assim como Samanta et al.¹⁰; que obtiveram seis isolados (15%) de *Salmonella sp.* provenientes de suabes cloacais de 40 aves em apenas uma localidade indiana no ano de 2014; Zhao et al.¹¹, que obtiveram 12,7% de isolamento de *Salmonella sp.* em amostras de uma única província chinesa pesquisando 300 amostras de excretas frescas colhidas no período de agosto a novembro de 2015, Magwedere et al.¹⁹, que analisaram 114 amostras de excretas provenientes de 30 lotes de frangos caipiras provenientes do sul da Austrália e identificaram o agente em 12 amostras representando 10,4%. Ressalta-se que essa diversidade e persistência ambiental tem proporcionado a contaminação e possibilitado a disseminação em diversos plantéis caipiras.

Pode-se observar que em diferentes países com amostragens em áreas mais restritas houve um percentual de isolamento superior ao encontrado neste trabalho, além de a amostragem ser variável sugere-se que um menor número de localidades amostradas pode influenciar nos resultados. Assim como as diferentes práticas de higiene podem de alguma forma ter contribuído para os altos índices nos diversos trabalhos.

A variação observada nos percentuais relatados neste trabalho pode estar associada à pouca tecnificação e controle sanitário nos sistemas de criação caipira, que mesmo sendo mais expostos às adversidades, conseguem se adaptar mais rapidamente quando comparados a animais de sistemas intensivos de criação.

Aceita-se que aves com maior rusticidade e adaptabilidade às condições desfavoráveis, passem por maiores desafios e se tornam portadoras assintomáticas do patógeno, havendo uma provável seleção às aves mais resistentes. Tal condição, talvez presente nas aves das quais foram colhidas amostras, conseqüentemente, representa um risco maior na disseminação do agente e na contaminação ambiental, o que pode ser decisivo na transmissão da *Salmonella sp.* para outros animais de criação e humanos.

Em relação aos sorovares observados houve consonância com os obtidos por Jacobsen e Hendriksen¹², que observaram maior ocorrência de *S. Agona* em países da América Latina, América do Norte e Europa, assim como os descritos por Clothier et al.⁸, que identificaram na Califórnia – Estados Unidos em 2017 diversos sorotipos, entre eles *Salmonella Agona* e provenientes de excretas de galinhas caipiras. Assim pondera-se que os resultados obtidos no presente estudo corroboram com a perspectiva de dispersão ambiental e persistência de diferentes sorovares às condições específicas desse sistema de criação.

Magwedere et al.¹³, analisaram a prevalência de *Salmonella* sp., durante o período de 2012 a 2014 na África do Sul e identificaram em 2012, 4,6%; em 2013, 5,7%; e em 2014, 4,7%. Após a sorotipificação foram identificados 188 sorovares inclusive *S. Typhimurium* que representou 4,0% das amostras, mesmo em um ambiente diverso do brasileiro, pode-se observar que há concordância com a diversidade de sorovares no meio ambiente, que pode estar sendo sustentado por características intrínsecas de resistência do sorotipo.

Chousalkar et al.¹⁴, sugeriram que aves silvestres e raposas têm importante papel na ecologia da *S. Typhimurium* e em surtos alimentares relacionaram ainda que fatores ambientais, como o frio, influenciam na adaptação de *S. Typhimurium* em animais criados livres e concluíram ainda que há necessidade de mais estudos epidemiológicos em sistemas de produção extensivos ou caipiras esta observação condiz com o observado nas produções caipiras da localidade deste trabalho.

Foi avaliado o efeito da exposição sequencial a estresses sub-letais utilizando o frio, ácidos e diferenças osmóticas e concluiu-se que estes fatores aumentaram a tolerância de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* quando inoculados experimentalmente em peito de frango e no sistema gastrointestinal; demonstrou que essa exposição a condições de estresse pode ajudar na sobrevivência de *Salmonella* sp. tanto no hospedeiro quanto no ambiente²³, contribuindo para a permanência do patógeno no meio.

Observa-se uma grande variedade de sorotipos de salmonela proveniente de excretas de aves em diversos países, esta diversidade pode estar relacionada com o modo de produção de aves caipiras e com suas características de rusticidade e maior tolerância às salmoneloses. Neste modo de produção as aves possuem acesso irrestrito ao meio ambiente e geralmente com poucas possibilidades de controle sanitário, permanecendo expostas aos perigos e elevando os riscos de infecção e disseminação de patógeno favorecendo assim o aumento da tolerância aos fatores adversos impostos pelo ambiente.

Em relação ao resultado do teste de resistência aos antimicrobianos apresentado no Quadro 01, observou-se que todos os sorotipos apresentaram sensibilidade a amoxicilina, aztreonam, ciprofloxacina, cloranfenicol, gentamicina, norfloxacina, sulfonamida, tetraciclina e a associação entre sulfa e trimetoprim. Por outro lado, um isolado de *S. Anatum* foi resistente a fosfomicina, e a cepa rugosa apresentou multirresistência (ceftiofur, enrofloxacin e fosfomicina).

Quadro 01 - Resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, dos isolados de *Salmonella enterica* obtidos de amostras de excretas de galinha caipira expostas ao comércio em feiras do município de Goiânia-Goiás

Antibiótico	S. Typhimurium	S. Agona	S. Anatum-1*	Cepa Rugosa	S. Anatum
Amoxicilina	S	S	S	S	S
Aztreonam	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	I	I	S
Cloranfenicol	S	S	S	I	S
Ceftiofur	S	S	S	R	S
Enrofloxacina	S	S	S	R	S
Fosfomicina	S	S	S	R	R
Gentamicina	S	S	S	S	S
Norfloxacina	S	S	S	S	S
Sulfonamida	S	S	S	I	I
Sufa+trimet	S	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S

S – Sensível. I- Intermediário. R – Resistente; 1* = foi utilizado para diferenciar o mesmo sorovar encontrado em regiões diferentes.

Em 60% (3/5) dos isolados, (S. Typhimurium, S. Agona, S. Anatum1) foi constatada sensibilidade a todos os antimicrobianos testados, um sorovar (S. Anatum) apresentou resistência apenas à fosfomicina, correspondendo a 20% (1/5) dos isolados e foi observada a resistência à diversos antimicrobianos (MDR), aqui considerado igual ou maior que três antibióticos, na cepa rugosa 20% (1/5), uma vez que este foi resistente ao ceftiofur, à enrofloxacina e a fosfomicina.

Os resultados encontrados são similares aos de Mahmud et al.¹⁸, que ao realizarem o teste de resistência aos antimicrobianos em 106 isolados de *Salmonella* sp., utilizando 10 antimicrobianos comumente empregados na medicina veterinária e humana obtiveram 26,4% dos isolados na condição de MDR, além de identificarem resistência a amoxicilina (99%), tetraciclina (98%), sulfametoxazol (60%), gentamicina (46%) e ciprofloxacina (40%).

Abdeen e Mousa¹⁷, em pesquisa em 2017, realizada em excretas de galinha caipira, no Egito, identificaram maiores níveis de resistência, divergindo dos resultados apresentados neste trabalho, pois submeteram seis isolados de *Salmonella enterica* e constataram 100% de resistência a amoxicilina, sulfonamida e trimetoprim, ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina; 83,3% para cloranfenicol; 33,3% gentamicina. Esta diferença no perfil de sensibilidade pode ser justificada pelo modo de

produção em diferentes países, com o uso de variadas técnicas de manejo, incluindo o uso de antibióticos.

Mesmo com a escassez de pesquisas envolvendo especificamente a identificação de *Salmonella sp.* em excretas de frangos caipiras observa-se que foi relatada resistência, na maioria dos artigos, às diversas classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos, cefalosporinas, ceféns e tetraciclina, inclusive aos antimicrobianos dos grupos dos fenicóis, fluorquinolonas, inibidores da via dos folatos, lipopeptídeos, macrolídeos, monobactâmico, nitrofurano, penicilinas e quinolonas; havendo sensibilidade apenas ao grupo das fosfomicina, o que não foi observado nesta pesquisa.

Entre as causas de resistência antimicrobiana, pode-se incluir o uso indiscriminado de antimicrobianos para prevenção e controle de doenças bacterianas durante o processo de produção, deixando resíduos na água ou no solo, conforme constatado por Jimenez et al.²⁶, que isolaram, em 2009, *Salmonella sp.*, de amostras de água da produção de galinha caipira resistentes às tetraciclina, sugerindo que há possibilidade de promoção da persistência de bactérias resistentes no ambiente e que pode ser considerada uma importante forma de transmissão desta característica, embora não tenha sido realizada neste trabalho.

Essa grande variedade de resistência demonstra a necessidade de se implementar medidas de controle no uso de antimicrobianos nas produções animais, principalmente às moléculas que são também de uso na medicina humana, uma vez que os produtos avícolas estão envolvidos em diversos surtos de doenças transmitidas por alimentos, principalmente a salmonelose, o que pode contribuir para a disseminação de bactérias resistentes ou multirresistentes ao homem.

Há uma grande preocupação com a emergência da multirresistência dos sorotipos de *Salmonella sp.* pois, além de gerar um grande impacto na eficácia do tratamento antimicrobiano apresenta ainda incremento na ocorrência de sorovares resistentes, podendo ocasionar o aumento na letalidade por infecções causadas por *Salmonella sp.* resistentes aos antimicrobianos²⁰.

Ao se avaliar a ocorrência de *Salmonella enterica*, o perfil sorológico, a susceptibilidade aos antimicrobianos associados à distribuição nas regiões em que foram isolados, pode-se inferir que há uma dispersão do agente com grande variabilidade e adaptabilidade em diferentes ambientes e que o uso de antimicrobianos necessita de uma melhor regulamentação e acompanhamento para este tipo de produção, no sentido de prevenir a ocorrência de salmoneloses em humanos e animais de produção.

Ao utilizar o método de tipagem molecular por PFGE foi possível verificar que os isolados deste estudo, apresentaram diferentes grupos clonais, uma vez que são sorotipos distintos, à exceção dos dois isolados de *S. Anatum* que pertencem ao mesmo grupo clonal.

Embora possa haver agrupamento de isolados de mesmo sorotipo em grupos clonais distintos¹⁰, não foi observado neste trabalho, uma das causas destes resultados é o rearranjo genético que as amostras podem realizar durante seu processo de multiplicação.

Como essas cepas foram isoladas de excretas colhidas em feiras localizadas em diferentes bairros de Goiânia, e em diferentes dias, sendo amostras ambientais, há a possibilidade de persistência destes sorotipos em condições ambientais, típicas do sistema de produção caipira. Ao se considerar as diferentes localizações das feiras infere-se que a disseminação pode ter ocorrido tanto verticalmente, através de ovos contaminados ou horizontalmente. No entanto, é difícil rastrear o ponto inicial da disseminação, considerando a complexidade epidemiológica de *Salmonella* sp., que pode envolver inclusive animais silvestre²⁷.

4. CONCLUSÃO

Há circulação de diferentes sorovares de *Salmonella* sp., em excretas de galinhas caipiras expostas à comercialização em feiras livres de Goiânia, Goiás. Assim como isolados resistentes a diferentes antibióticos testados.

A dispersão de grupos clonais distintos no sistema de produção caipira demonstra que é de fundamental importância que se implemente medidas sanitárias que assegurem a diminuição da ocorrência de *Salmonella* sp. neste sistema assim como possa restringir a veiculação alimentar deste patógeno.

A presença de uma cepa rugosa, multirresistente pode servir de indicativo de risco quanto a circulação de *Salmonella* sp. com esta característica o que representa um risco à população humana que necessita de medidas de controle desde a produção primária até a manipulação final do produto

5. REFERÊNCIAS

1. Mascarenhas G, Dolzani MCS. Feira livre: territorialidade popular e cultura. *Ateliê Geográfico*. 2008;2(2):72–87.
2. Clementino CD, Martins DM, Britto FB, Barbosa FJ, Lima PD, Diniz FM. Variabilidade fenotípica e genotípica em galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*): Resultados preliminares. *Embrapa*. 2006;46:1–4.
3. Vita GF, Ferreira I, Pereira MAC, Azevedo JR, Sanavria A, Barbosa CG, Gallo SS, Vasconcelos HG. Eficácia de *Chenopodium ambrosioides* (erva-de-santa-maria) no controle de endoparasitos de *Gallus gallus* (galinha caipira). *Pesqui. Vet. Bras*. 2014;34(1):39–45.
4. Guimarães HK. Análise de prevalência de salmonelose em criações não tecnificadas de *Gallus gallus* no Distrito Federal. [Dissertação]. Brasília; Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária. 2006.
5. Marchesi JÁ, Araldi-Favassa CT. Estudo da incidência de *Salmonella* Enteritidis em populações de galinhas caipiras no município de concórdia (Santa Catarina, Brasil) por meio de teste sorológico. *Ágora*. 2011;18(1):29-34.
6. Barrett TJ, Gerner-Smidt P, Swaminathan B. Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. *Foodborne Pathog. Dis*. 2006;3:20–31.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 2015. 73p
8. Control Diseases Centre (CDC) PulseNet. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157: H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017;157:1–16.
9. Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecological Society of America Stable*. 1945;12:297-302.
10. Ghoddusi A, Fasaei BN, Salehi TZ, Akbarein H. Prevalence and characterization of multidrug resistance and variant *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella* isolates from cattle, poultry and humans in Iran. *Zoonoses Public Health*. 2019;66:587–596.
11. Hidas HW. Detecção de *Salmonella* sp., *Mycoplasma* spp . e *Escherichia coli* de aves sinantrópicas da região metropolitana de Goiânia-Goiás. [Tese]. Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia. 2013.
12. Moyle T, Drake K, Gole V, Chousalkar K, Hazel S. Bacterial contamination of eggs and behaviour of poultry flocks in the free range environment. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis*. 2016;49:88–94.
13. Nair, DV, Johny A. Food safety in poultry meat production. Springer. 2019; 309p. doi:10.1007/978-3-030-05011-5
14. Alegria-Moran R, Rivera D, Toledo V, Moreno-Switt AI, Hamilton-West C. First detection and characterization of *Salmonella* spp. In poultry and swine raised in backyard production systems in central Chile. *Epidemiol. Infect*. 2017;145:3180–3190.
15. Clothier KA, Kim P, Mete A, Hill AE. Frequency, serotype distribution, and antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonella* in small poultry flocks in

- California. J. Vet. Diagnostic Investig. 2018;30:471–475.
16. Ojo OE, Ogunuinka OG, Abgaje M, Okuboye JO, Kehinde OO, Oyekunl MA. Antibioqram of *Enterobacteriaceae* isolated from free-range chickens in Abeokuta, Nigeria. Vet. Arh. 2012;82:577–589.
 17. Samanta I, Joardar SN, Das PK, Sar TK, Bandyopadhyay S. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serotypes isolated from backyard poultry flocks in West Bengal , India. J. Appl. Poult. Res. 2018;23:536–545.
 18. Zhao X, Gao Y, Yian C, Yang L, Wang T, Chang Wang C. Prevalence and characteristics of *Salmonella* isolated from free-range chickens in Shandong province, China. Biomed Res. Int. 2016;2016:6.
 19. Manning J, Gole V, Chousalkar K. Screening for *Salmonella* in backyard chickens. Prev. Vet. Med. 2015; 120:241–245.
 20. Jacobsen A, Hendriksen RS. The *Salmonella enterica* Pan-genome. Microb. Ecol. 2011;62:487–504.
 21. Magwedere K, Rauff D, De Klerk G, Keddy KH, Dziva F. *Incidence* of nontyphoidal *Salmonella* in food-producing animals, animal feed, and the associated environment in South Africa, 2012-2014. Clin. Infect. Dis. 2015;61:283–289.
 22. Chousalkar K, Gole V, Caraguel C, Rault, JL. Chasing Salmonella Typhimurium in free range egg production system. Vet. Microbiol. 2016;192:67–72.
 23. Melo ANF, Souza GT, Schaffner D, Oliveira TCM, Maciel JF, Souza EL, Nadja MM. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of Salmonella Enteritidis PT4 and Salmonella Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. Int. J. Food Microbiol. 2017;251:15–23.
 24. Mahmud MS, Bari ML, Hossain MA. Prevalence of *Salmonella* serovars and antimicrobial resistance profiles in poultry of Savar Area, Bangladesh . Foodborne Pathog. Dis. 2011;8:1111–18.
 25. Abdeen E, Mousa WS. Antibioqram and genetic diversity of *Salmonella enterica* with zoonotic potential isolated from morbid native chickens and pigeons in Egypt. J. Appl. Microbiol. 2019;124:1–19.
 26. Jiménez M, Martínez-Urtaza J, Chaidez C. Geographical and temporal dissemination of salmonellae isolated from domestic animal hosts in the Culiacan Valley, Mexico. Microb. Ecol. 2011;61:811–820.
 27. Penha Filho RAC, Ferreira JC, Kanashiro AMI, Berchieri Junior A, Darini ALC. Emergent multidrug-resistant nontyphoidal *Salmonella* serovars isolated from poultry in Brazil coharboring *bla*CTX-M-2 and *qnr*B or *bla*CMY-2 in large plasmids. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2019;95:93–98.

CAPÍTULO 3 - IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp. EM AMOSTRAS DE CARÇAÇAS E OVOS DE FRANGOS CAIPIRAS COMERCIALIZADOS EM FEIRAS DE GOIÂNIA, GOIÁS.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi detectar *Salmonella* sp., em carcaças de frango e ovos caipiras comercializados em feiras livres de Goiânia, Goiás. Nas carcaças, por meio da pesquisa bacteriológica convencional foram obtidos 6/100, (6%) de carcaças e 3/150, (2%) de ovos positivas para *Salmonella* sp. No teste de susceptibilidade antimicrobiana, foi verificado que nos isolados obtidos de carcaças houve sensibilidade ao aztreonam, à amoxicilina, cloranfenicol, gentamicina, norfloxacin, a sulfonamida, tetraciclina e a associação entre sulfonamida e trimetoprim. Por outro lado, foi observada a resistência ao ceftiofur 1/6 (16,7%), fosfomicina 2/6 (33,3%), ciprofloxacina e enrofloxacin 3/6 (50,0%). Quanto aos isolados de ovos não houve resistência a nenhum dos antimicrobianos avaliados. Identificou-se nas carcaças os sorovares, *Salmonella* Cerro (1), *S. Corvalis* (1), *S. Panama* (1), O:3,10 (1); O:4,5 (1), e uma cepa rugosa, enquanto que nos ovos foi identificada *S. Corvalis* (3). Foi realizado o teste de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE) e identificado o mesmo grupo clonal para os isolados de *S. Corvalis* tanto nos ovos quanto na carcaça. Para os demais sorotipos constatou-se que pertenciam a diferentes grupos clonais. Há circulação de *Salmonella* em carcaças e ovos de galinhas caipiras comercializadas nas feiras livres de Goiânia assim como a confirmação de resistência aos antimicrobianos e homogeneidade clonal para mesmo sorovar.

Palavras-chave: produtos de origem animal, resistência aos antibióticos, salmonelose.

ABSTRACT

The objective of this study was to detect *Salmonella* sp., in chicken carcasses and free-range eggs sold at fairs in Goiânia, Goiás. In carcasses, through conventional bacteriological research, were obtained 6/100 (6%) of carcasses and 3/150 (2%) of eggs positive for *Salmonella* sp.. In the antimicrobial susceptibility test, it was found that in isolates obtained from carcasses there was sensitivity to aztreonam, amoxicillin, chloramphenicol, gentamicin, norfloxacin, sulfonamide, tetracycline and the association between sulfonamide and trimethoprim. On the other hand, resistance to ceftiofur 1/6 (16.7%), fosfomicin 2/6 (33.3%), ciprofloxacin and enrofloxacin 3/6 (50.0%) was observed. For eggs isolates there was no resistance to any of the antibiotics tested. The following Serovars were identified in the carcasses, *Salmonella* Cerro (1), *S. Corvalis* (1), *S. Panama* (1), O: 3.10 (1); O: 4.5 (1), and one rough strain; whereas in the eggs *S. Corvalis* was identified. Pulsed Field Electrophoresis (PFGE) was performed and the same clonal group was identified for the isolates of *S. Corvalis* in both eggs and carcass. For the other serotypes it was found that they belonged to different clonal groups. *Salmonella* circulation was detected in carcasses and eggs of free-range chickens sold at Goiânia fairs as well as confirmation of antimicrobial resistance and clonal homogeneity for same serovar.

Keywords: Products of animal origin, antibiotic Resistance, salmonellosis.

1. INTRODUÇÃO

A origem das feiras livres remonta ao século IX na Europa, onde os mercados locais eram organizados para suprir a população local com os gêneros de primeira necessidade¹. No Brasil, a feira livre constitui uma modalidade de mercado varejista ao ar livre, de periodicidade semanal, organizada como um serviço de utilidade pública pela municipalidade e voltada para a comercialização local de gêneros alimentícios e produtos básicos provenientes de diversas regiões².

Não há muito controle sanitário e comercial nos diferentes produtos de origem vegetal ou animal comercializados nas feiras, a ponto de não se ter dados oficiais precisos sobre o volume e os tipos de produtos comercializados.

A contaminação de produtos de origem animal é uma preocupação constante, porque é difícil de se realizar o controle de forma eficiente. Muitos fatores podem estar envolvidos na contaminação, incluindo os do meio ambiente, a fauna associada, a água de diferentes fontes e o descarte de resíduo gerado; além do manejo animal e dos humanos relacionados durante as práticas de abate, processamento e armazenamento³.

A produção de frango ao ar livre é um segmento promissor do setor avícola, envolvendo raças de crescimento lento, que apresentam carnes com características sensoriais diferentes daquelas criadas em confinamento, exibindo carne mais escura, mais firme e sabor acentuado. Sua produção visa atender a um nicho de mercado constituído por consumidores mais exigentes e com maior apelo de compra⁴.

Aves, produtos cárneos e ovos são as fontes alimentares mais associadas aos surtos de salmonelose, embora também possam envolverem outros gêneros alimentícios^{5,6}. A presença de *Salmonella* sp. em ovos é em grande parte devido à sua capacidade de colonizar o tecido ovariano e a superfície dos ovos durante a formação^{7,8}.

Salmonellas são microrganismos Gram negativos que incluem as espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, dos quais apenas o primeiro é de relevância clínica para humanos e animais. *S. enterica* inclui mais de 2.600 sorovares⁷.

Em diversos estudos constatou-se que *Salmonella Enteritidis* é o principal sorovar causador de salmonelose e o mais prevalente em produtos derivados de frangos. Por isso tem-se a necessidade de controlar sua presença em alimentos, principalmente os de origem animal⁹.

Carne de aves e ovos são importantes para atender às necessidades dietéticas da população humana em constante crescimento, além de constituir uma proteína de valor

acessível. A produção avícola eficiente, no entanto, requer o uso de produtos farmacêuticos, como antimicrobianos, que podem ser utilizados como agentes profiláticos e terapêuticos que visam garantir o rápido crescimento e a manutenção da saúde animal.

No entanto, seu uso inadequado pode resultar em acúmulo de resíduos na carne e nos ovos das aves tratadas, o que pode afetar a saúde do consumidor, gerando reações alérgicas e veiculando bactérias resistentes. Como forma de controle as autoridades reguladoras vêm adotando medidas para restringir o uso inadequado de vários medicamentos para uso animal, a fim de fornecer alimentos de origem animal seguros para os seres humanos¹.

Na segurança dos alimentos inclui-se a resistência bacteriana, que pode ser pelos microrganismos presentes ou por resíduos de antimicrobianos presentes na carcaça, em dose sub terapêutica, mas que pode selecionar bactérias com menor sensibilidade ou com maior resistência aos produtos¹⁰.

Considerando a importância de *Salmonella* sp., em sanidade animal e sua disseminação ambiental, com o fato de comprometer o plantel avícola nacional e acarretar problemas relacionados ao uso indiscriminado como a resistência bacteriana. O objetivo deste trabalho foi identificar genotípica e fenotípica isolados de *Salmonella* sp. provenientes de amostras de carcaças e ovos de frangos caipiras comercializados em feiras de Goiânia, Goiás.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostras

Foram visitadas 118 feiras livres em Goiânia, no período de setembro de 2017 a setembro de 2018, para a colheita de 100 amostras de carcaças de frangos e de 50 dúzias de ovos caipiras expostos à venda, amostra definida por conveniência e colhidas ao acaso. As carcaças foram adquiridas em 54 feiras enquanto que os ovos colhidos em 33 feiras de Goiânia sendo que o número de amostras por feira foi variável de uma a seis unidades segundo o porte da feira.

Imediatamente após a colheita, as carcaças foram acondicionadas em caixa isotérmica contendo gelo reciclável e os ovos foram transportados à temperatura ambiente até o Laboratório de Bacteriologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Goiás.

2.2. Pesquisa de *Salmonella* sp.

As amostras de carcaça foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* em conformidade com o protocolo definido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹¹, com adaptações. Foram colhidas 25 g de pele e músculo da região de pescoço e da região peri cloacal¹².

Cada dúzia de ovos deu origem a uma amostra de casca, uma de albúmen e uma de gema, compondo um *pool* por estrutura. Foi utilizado algodão estéril embebido em álcool etílico a 70% antes de se proceder a quebra da casca. Após a transferência do conteúdo para uma placa de Petri estéril a casca foi colocada com a parte aberta voltada para baixo para escorrer o excesso de albúmen.

Com o uso de seringa de 10mL, o albúmen foi extraído e acondicionado em um *becker* estéril e a gema em outro, formando o *pool* a ser analisado. Foram aliqüotados 25 g de casca, 25 mL de albúmen e 25 mL de gema e adicionados a 225mL de água peptonada tamponada (APT) a 1% e incubados a 37°C por 18 a 24 horas.

2.3. Sorotipificação

Os isolados de *Salmonella* foram enviados ao Laboratório de Referência Nacional para Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro - RJ, para tipagem sorológica realizada pelo esquema de Kauffmann-White-Le Minor.

2.4. Teste de Resistência aos antimicrobianos

Para a realização do teste de resistência aos antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em ágar com discos de antibióticos em meio Muller Hinton, conforme descrito pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)¹³.

Os antibióticos testados foram amoxicilina 10µg (AMO), aztreonam 30µg (AZT), ceftiofur 30µg (CEF), ciprofloxacina 5µg (CIP), cloranfenicol 30µg (CLO), enrofloxacina (ENO), fosfomicina 200µg (FOS), gentamicina 10µg (GEN), norfloxacina 10µg (NOR), sulfonamida 300µg (SUL), sulfonamida com trimetoprim 25µg (SUT) e tetraciclina 30µg (TET).

A leitura dos halos de inibição foi realizada conforme definido pelo CLSI¹³. Os isolados foram classificados como sensível, intermediário ou resistente para cada antibiótico, após comparação com os critérios.

2.5. Eletroforese de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE)

A Eletroforese de Campo Pulsado - PFGE foi realizada no Laboratório de Referência Nacional para Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde do Brasil. Foram enviadas ao laboratório amostras estocadas em ágar nutriente.

O teste foi realizado de acordo com o protocolo do Centro de Controle de Doenças (CDC)¹⁴. O método de tipagem molecular pela PFGE foi realizado com a digestão pela enzima XbaI sendo que os padrões de similaridade dos pulsotipos foram analisados e comparados entre si usando coeficiente de DICE¹⁵ por meio do *Gel Compare II Software* (Matemática Aplicada)¹⁶.

2.6. Análise estatística

Para interpretação dos resultados encontrados, foi realizada estatística descritiva através da frequência dos dados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 100 carcaças analisadas, 6% (6/100) foram positivas para *Salmonella* sp, e os isolados foram identificados como *Salmonella* Corvallis (1), *S. Cerro* (1), *S. Panama* (1), *Salmonella* fórmula antigênica O:4,5 (1) e O:3,10 (1); e uma cepa rugosa.

Li et al.¹⁷, identificaram 8,4% dos 369 isolados como *Salmonella* Corvallis, em carcaças de frangos comercializadas em feiras na China em 2016, utilizando bacteriologia convencional concluindo que o isolamento se deve às precárias condições sanitárias durante o processamento das carcaças; esta característica não pode ser observada, apenas deduzidas, pois as carcaças já se encontravam expostas ao comércio.

Moraes et al.¹⁸ isolaram *Salmonella enterica* em 2,8% das amostras analisadas de diversas origens como suabes de gaiolas, de bebedouros, de cloacas assim como em rações e insetos oriundos da produção de galinhas poedeiras comerciais utilizando a bacteriologia; dos isolados 16,7% foram de *Salmonella* Cerro, sugerindo a contaminação horizontal como uma importante forma de dispersão do patógeno¹⁸. Considerando a origem do isolado de *Salmonella* Cerro (carcaça), sugere-se provavelmente a mesma forma de contaminação (horizontal) das amostras obtidas uma vez que pode ter ocorrido a contaminação cruzado por falhas de higiene do manipulador.

S. Cerro é um dos sorovares mais isolados de amostras clínicas humanas, no entanto este sorovar foi responsável por apenas 3,0% dos casos clínicos relatados por ano no EUA. Entretanto em 2016, *S. Cerro* foi o quarto, mais comum, sorovar isolado em casos clínicos de animais e o segundo na produção animal. Isolados de *S. Cerro* raramente têm significância na taxa de invasão celular quando comparada com amostras de *S. Typhimurium* e *S. Newport*. Ainda não está esclarecida a causa da baixa habilidade invasiva deste sorovar não apresentando, ainda relevância na epidemiologia de infecções humanas, mesmo sendo isolado de carnes vermelhas e de aves¹⁹.

Recentemente, *Salmonella* Cerro foi um dos sorotipos mais prevalentes em isolados da produção animal norte americana e associado a alguns casos de gastroenterite humana. Isto pode indicar o início de uma cepa emergente que pode afetar escala global, no entanto ainda não foi sorotipada em Taiwan²⁰. Desta forma deve-se avaliar criteriosamente a dispersão deste sorovar e acompanhar o avanço em diferentes países.

O isolamento de 6% (6/100) aqui registrado foi inferior ao encontrado por Ribeiro²¹, que isolou 28%, (17/60) em amostras de carcaças de frangos caipiras comercializados em açougues na Bahia. Esta diferença pode ser justificada pela origem das amostras analisadas uma vez que em amostras de açougue há maior manipulação do

produto na elaboração de cortes e uso dos expositores que podem influenciar a ocorrência do patógeno; enquanto que em galinhas caipiras a evisceração é individualizada e o risco de extravasamento de conteúdo intestinal e seu contato direto com a carcaça é reduzido.

Resultados superiores também foram obtidos por Silva²², que descreveu 50% (6/12) de isolamento no Rio Grande do Norte em 2012, justificando problemas no pré-abate como o acesso ao pasto, o contato com aves silvestres e insetos como fatores que contribuem para o aumento da contaminação da carcaça. Os resultados do presente estudo igualmente foram inferiores aos de Zonta et al.²³, que isolaram 2/3 (66,67%) de carcaças amostradas em feiras do Paraná. Observa-se que mesmo havendo um baixo número absoluto de isolamento deste agente no presente estudo, a identificação de *Salmonella sp.* nas carcaças expostas nas feiras amostradas, podem ser causa de surtos de gastroenterites humanas, provavelmente subnotificadas e de difícil relação com a fonte de contaminação.

Na análise de suscetibilidade aos antimicrobianos, não foi verificada resistência à amoxicilina, aztreonam, cloranfenicol, gentamicina, norfloxacin, sulfonamida, tetraciclina e a sulfonamida/trimetoprim; no entanto foi observada resistência ao ceftiofur 1/6 (16,7%), fosfomicina 2/6 (33,3%), enrofloxacin 3/6 (50,0%) e ciprofloxacina 3/6 (50,0%); foi confirmado ainda que a cepa rugosa foi multirresistente (Quadro 1).

Quadro 1 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em isolados de *Salmonella enterica* de amostras de carcaças de frango caipira comercializados em feiras de Goiânia, Goiás.

Antimicrobiano	Isolados de <i>Salmonella enterica</i>					
	O:4,5	Corvalis	Cerro	Panama	Rugosa	O:3,10
Amoxicilina	S	S	S	S	S	S
Aztreonam	S	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	R	I	S	R	R	I
Cloranfenicol	S	S	S	S	I	S
Ceftiofur	S	S	S	S	R	S
Enrofloxacin	S	R	S	R	R	I
Fosfomicina	R	S	S	S	R	S
Gentamicina	S	S6	S	S	S	S
Norfloxacin	S	S	S	S	S	S
Sulfonamida	S	S	S	S	I	S
Sulfonamida/trimetoprim	S	S	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S	S

S – Sensível, I – Intermediário, R – Resistente.

Ao se comparar os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos obtidos neste trabalho com o realizado utilizando frangos e suínos, por Abdeen e Moura²⁴, em 2018, no

Egito, relataram maiores índices de resistência em relação a todos os antibióticos testados em comum, ou seja 100% (6/6) de resistência a amoxicilina, sulfonamida e trimetoprim, ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina; 83,3% (5/6) ao cloranfenicol; 33,3% (2/6) à gentamicina. Mesma observação quanto à pesquisa desenvolvida por Samanta et al.²⁵, na Índia, que identificaram 100% de resistência ao cloranfenicol, ciprofloxacina, norfloxacina, tetraciclina nos isolados de *Salmonella* sp., em carcaças de frangos. Os altos índices de resistência podem estar associados ao acesso indiscriminado aos antimicrobianos e a parca legislação ao sistema de produção caipira.

Em isolados de *Salmonella* sp., de frangos de corte, em Trinidad e Tobago, em 2017, foi identificada altos índices de resistência às quinolonas, tetraciclina e sulfonamidas, enquanto que às cefalosporinas de terceira geração foi rara, em carcaças de galinhas caipiras²⁶, o fácil acesso aos três primeiros grupos de antimicrobianos, quer seja pelo baixo custo ou por terem maior indicação por parte de atendentes de agropecuárias podem interferir positivamente para a elevação do índice, é importante ressaltar que todos os antimicrobianos constituem, de certa forma uma preocupação à saúde pública.

O resultado da análise da PFGE permitiu concluir que cada um dos seis isolados de *Salmonella* apresentaram diferente grupo clonal entre si, não havendo relação genética e não possibilitando relacionar uma possível dispersão gênica, ou mesmo prováveis fontes de contaminação para as carcaças analisadas.

Quanto as 50 dúzias (150 amostras) de ovos três amostras 2% (3/150), uma de cada estrutura do ovo, foram positivas para *Salmonella* em análise bacteriológica convencional e todas pertencentes ao sorovar *Salmonella* Corvallis, enquanto que a PFGE permitiu identificar que todos os sorovares são do mesmo grupo clonal.

Resultados similares de isolamento em ovos caipiras, foram encontrados por Wolschick e Bosco²⁷, no Rio Grande do Sul, identificando média de 2,36% para o período entre 2010 a 2014 e Mogollón et al.⁶ em 2016 relataram 2,93% em cascas de ovos na Colômbia e identificaram como fatores de risco de contaminação a frequência de higienização do local de exposição e temperatura de armazenamento, esses mesmos fatores podem ser considerados em ovos vendidos em feiras livres, que geralmente ficam expostos ao ar livre, sem proteção e suscetível às intempéries.

Resultado inferiores foram encontrados por Filho et al.⁸, no Ceará, em 2014, assim como em 2015 no Rio de Janeiro²⁸ e por Mottin; Compodônio; Damásio²⁹, em 2015 na Bahia não encontraram *Salmonella* sp. em ovos caipiras em nenhuma de suas estruturas

assim como Samanta et al.²⁵ na Índia em 2014, Manning; Gole; Chousalkar³⁰, que também não obtiveram resultado positivo para *Salmonella enterica*. Sugerindo menor contaminação ambiental nos locais de postura, ou mesmo melhores sistemas de coletas de ovos durante o dia, pois há menor tempo de contato dos ovos com o meio ambiente e com os prováveis contaminantes, desta forma os ovos caipiras que permanecem maior período no ninho em outro ambiente podem apresentar maior contaminação em suas estruturas.

Ao se proceder a análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Salmonella enterica*, das amostras de ovos das feiras de Goiânia não foi constatada a resistência a nenhum antimicrobiano no entanto foi constatado intermediário a um antimicrobiano no isolado da casca.

Há uma grande variedade dos perfis de resistência aos antimicrobianos verificada em diversos países, tanto para isolados de *Salmonella enterica* de ovos quanto de carcaças. As diferentes ocorrências de isolados em amostras de ovos podem ser atribuídas às condições de manejo, às características ambientais da produção assim como a forma ou frequência de coleta de ovos, sendo consideradas ainda suas características sanitárias.

O resultado da análise da PFGE demonstrou que todos os isolados dos ovos, que são do mesmo sorotipo, pertencem ao mesmo pulsotipo sugerindo que pode ter havido contaminação entre as estruturas analisadas, ou mesmo a capacidade de o agente se instalar na casca e utilizando mecanismos de escape permear o albúmen até alcançar a gema.

Ao se associar o resultado da PFGE do isolado de *Salmonella* Corvallis encontrado na carcaça com os das estruturas dos ovos pode-se verificar que fazem parte do mesmo grupo clonal, (Figura 1), embora sejam de produtos e de feiras distintas, sugerindo uma dispersão do sorotipo na região avaliada.

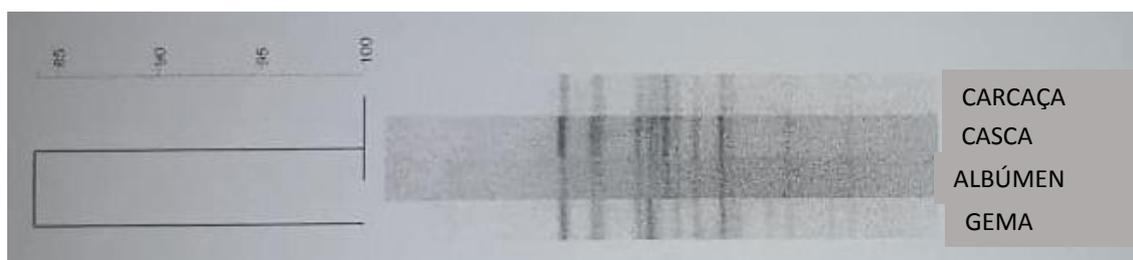


Figura 1. Resultado da Eletroforese em Campo Pulsado de isolados de *Salmonella* Corvallis de amostras de carcaças e ovos de galinhas caipiras comercializados em feiras livres de Goiânia. Demonstra que dos pulsotipos têm similaridade maior que 85% compondo o mesmo grupo clonal.

4. CONCLUSÃO

Demonstra-se a ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças e ovos, do sistema de produção caipira comercializados em feiras de Goiânia, Goiás, assim como a ocorrência da resistência a alguns antibióticos em isolados de carcaças.

A resistência de *Salmonella* sp., a antimicrobianos testados, sugere que deve haver maior controle no uso destes produtos assim como a necessidade de mais estudos para ampliar o conhecimento sobre as formas de aquisição da resistência neste sistema de produção.

Percebe-se ainda que pela eletroforese de campo pulsado há dispersão de diferentes pulsotipos em diferentes sorotipos, no entanto, no mesmo sorotipo de diferentes amostras, todos os isolados pertencem ao mesmo grupo clonal, sugerindo mesma fonte de contaminação.

5. REFERÊNCIAS

1. Sato L. Processos cotidianos de organização do trabalho na feira livre. *Psicol. e Soc.* 2007;1:95–102.
2. Mascarenhas G, Dolzani MCS. Feira Livre: Territorialidade popular e cultura. *Ateliê Geográfico.* 2008;2(2):72–87.
3. Rocchi L, Paolotti L, Rosati A, Boggia A, Castellini C. Assessing the sustainability of different poultry production systems: A multicriteria approach. *J. Clean. Prod.* 2019;211:103–114.
4. Clementino CD, Martins dm, Britto FB, Barbosa FJ, Lima PD, Diniz FM. Variabilidade fenotípica e genotípica em galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*): Resultados preliminares. *Embrapa.* 2006;46:1–4.
5. Whiley H, Ross K. *Salmonella* and eggs: From production to plate. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2015;12:2543–2556.
6. Alzwghaibi AB, Yahyaraeyat R, Fasaei BN, Langeroudi AG, Salehi TZ. Rapid molecular identification and differentiation of common *Salmonella* serovars isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay. *Arch. Microbiol.* 2018;200:1009–1016 (2018).
7. Mogollón Vergara DC, Rodríguez Gutiérrez VE, Verjan García N. Prevalence and molecular identification of *Salmonella* spp. isolated from commercialized eggs at Ibagué, Colombia. *Rev. Salud Anim.* 2016;38(3):164–172.
8. Gomes Filho VJR, Teixeira RSC, Lopes ES, Albuquerque AH, Lima SV, Horn RV, Rocha RC, Cardoso WM. Pesquisa de *Salmonella* spp. em galinhas criadas em fundo de quintal (*Gallus gallus domesticus*) e ovos comercializados nas feiras livres na cidade de Fortaleza, Ceará. *Semin. Agrar.* 2014;35(4):1855–64.
9. Augusto J, Marchesi P. Estudo da incidência de *Salmonella* Enteritidis em populações de galinhas caipiras no município de concórdia (Santa Catarina, Brasil) por meio de teste sorológico. *Ágora.* 2011;18(1):29-34.
10. Silva TM, Milbradt EL, Zamae JC, Andreatti Filho RL, Okamoto AS. Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importância aviária-impactos em saúde pública. *Arch. Microbiol.* 2016;21:9–20.
11. Brasil, M. da S. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. (Ministério da Saúde, 2011).
12. Melo JMMC, Nascimento KO, Barbosa JL, Saldanha T, Barbosa MIMJ. Diagnóstico e qualidade microbiológica de ovos caipiras produzidos por agricultores familiares. *Rev. Bras. Ciência Veterinária.* 2015;22:48–53.
13. Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. CLSI. 2015.73p
14. Control Diseases Centre PulseNet. Standard operating procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157: H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. 2017;157:1–16.
15. Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecological Society of America Stable Ecology.* 1945;26:297–302.
16. Ghodduzi A, Fasaei BN, Salehi TZ, Akbarein H. Prevalence and characterization of multidrug resistance and variant *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella*

- isolates from cattle, poultry and humans in Iran. *Zoonoses Public Health*. 2019;66:587–596.
17. Li Y, Pei X, Zhang X, Wu L, Liu Y, Zhou H, Ma G, Chen Q, Liang D. A surveillance of microbiological contamination on raw poultry meat at retail markets in China. *Food Control*. 2019;104:99–104.
 18. Moraes DMC, Andrade MA, Duarte SC, Bastos TS, Arnhold E, Jayme VS, Nunes IA. Phenotypic and molecular detection of *Salmonella* sp. on growing, rearing and production phases in a commercial group of laying hens. *Pesqui. Vet. Bras*. 2016;36:503–508.
 19. Cheng RA, Eade CR, Wiedmann M. Embracing diversity: Differences in virulence mechanisms, disease severity, and host adaptations contribute to the success of nontyphoidal salmonellas a foodborne pathogen. *Front. Microbiol*. 2019;10:1–20.
 20. Boukoucha M, Menasria T, Bouguerra N. Phenotypic characterization and genotypic subtyping of *Salmonella enterica* Serovars Enteritidis and Gallinarum isolated from human and poultry-related samples. *Food Biotechnol*. 2018;32:206–221.
 21. Ribeiro JGN. Ocorrência de *Salmonella* sp . em frangos *in natura* provenientes de estabelecimentos comerciais do município de Feira de Santana – BA.[Dissertação]. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia; 2014.
 22. Silva DCF. Comparativo das características das carnes de frango caipira e industrial da região oeste do rio grande do norte. [Dissertação]. Universidade Federal Rural do Semi-Árido; 2012.
 23. Zonta G, Souza DC, Costa MR, Bonesi G, Costa RG, Alegro LC, Santana EH. Qualidade microbiológica de produtos cárneos e lácteos comercializados em feiras livres de Arapongas-PR. *Cient Ciênc Biol Saúde*. 2013;015:377–384.
 24. Abdeen E, Mousa WS. Antibigram and genetic diversity of *Salmonella enterica* with zoonotic potential isolated from morbid native chickens and pigeons in Egypt. *J. Appl. Microbiol*. 2019;124:1–19.
 25. Samanta I, Joardar SN, Das PK, Sar TK, Bandyopadhyay S. Prevalence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serotypes isolated from backyard poultry flocks in West Bengal , India. *J. Appl. Poult. Res*. 2018;23:536–545.
 26. Jordan AB, Bolfa P, Marchi S, Hemmings S, Major T, Suepaul R, Blake L, Oura C. Detection of antibodies to seven priority pathogens in backyard poultry in Trinidad, West Indies. *Vet. Sci*. 2018;5:11.
 27. Wolschick J, Bosco SMD. Prevalence of *Salmonella* spp. in chicken shell eggs produced and commercialized in Rio Grande do Sul. *Rev. Destaques Acadêmicos*. 2015;7:182–187.
 28. Rio de Janeiro. Secretaria Estadual de Saúde. Encontro estadual sobre zoonose e doenças de transmissão vetorial. Rio de Janeiro; 2015.
 29. Mottin VD, Lopes VC, Damásio JMA. Contaminação por *Salmonella* em ovos de granja e caipira em um município do interior da Bahia. *Ciência Desenvolv*. 2016;9:150–157.
 30. Manning J, Gole V, Chousalkar K. Screening for *Salmonella* in backyard chickens. *Prev. Vet. Med*. 2015;120:241–245.

CAPÍTULO 4 - DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Salmonella* spp. ISOLADOS DE EXCRETAS, OVOS E CARÇAÇAS DE GALINHAS CAIPIRAS COMERCIALIZADAS EM FEIRAS DE GOIÂNIA, GOIÁS

RESUMO

As doenças veiculadas por alimentos (DVA), causadas por bactérias constituem um problema na saúde humana mundial. O objetivo do trabalho foi identificar pela técnica da PCR a presença de *Salmonella* sp. e de genes de resistência em excretas, carcaças e ovos de galinha caipira comercializados em feiras de Goiânia-Goiás, Brasil. Foram colhidas, aleatoriamente 100 amostras de excretas, 100 carcaças e 50 dúzias de ovos caipiras nas 118 feiras livres em diversos bairros do município de Goiânia, Goiás, no período de julho de 2017 a outubro de 2018. Posteriormente, foi pesquisada a presença de *Salmonella* sp. através de métodos bacteriológicos convencionais. A detecção de *Salmonella* spp., foi realizada com a utilização do gene *invA*, específico para o gênero. Foram utilizados os genes *bla*_{TEM}, *qnrS* e *aadA2* que codificam a resistência aos antimicrobianos dos grupos de beta lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, respectivamente. Pela técnica da PCR convencional, demonstrou a presença de *Salmonella* em sete amostras de carcaça, nove de excretas e cinco de ovos, sendo três nas cascas, uma no albúmen e outra na gema. Foi detectada a presença do gene *bla*_{TEM} em quatro amostras (19,05%); do gene *qnrS* em cinco amostras (23,81%) e do *aadA2* não foi verificado. *Salmonella* sp. está presente em carcaças, ovos e excretas examinadas, com a confirmação dos genes de resistência apenas em carcaças e excretas.

Palavras-chave: antibiótico, produção alternativa, resistência bacteriana, salmonelose.

ABSTRACT

Foodborne diseases caused by bacteria are a problem in human health worldwide. The objective of this work was to identify by PCR technique the presence of *Salmonella sp.* and the resistance genes in excretes, carcasses and free-range chicken eggs sold at fairs in Goiânia-Goiás, Brazil. A total of 100 samples of excretes, 100 carcasses and 50 dozen of free-range eggs were randomly collected at the 118 fairs in several neighborhoods in the municipality of Goiânia, Goiás, from July 2017 to October 2018. Subsequently, the presence of *Salmonella sp.* was studied through conventional bacteriological methods. The detection of *Salmonella spp.*, was performed using the gene *invA*, specific to gender. In the study were used the genes *bla*TEM, *qnrS* and *aadA2* encoding antimicrobial resistance from beta lactam, quinolone and aminoglycosides groups, respectively. According to conventional PCR, it showed the presence of *Salmonella* in seven carcass samples, in nine excretes samples and five in eggs that were three in the shells, one in the albumen and the other in the yolk. The presence of the *bla*TEM gene was detected in four samples (19.05%); from the *qnrS* gene in five samples (23.81%) and from *aadA2* has not been verified. *Salmonella sp.* is present in carcasses, eggs and excretes examined, with confirmation of resistance genes only in carcasses and excretes.

Keywords: Antibiotic, alternative production, bacterial resistance, salmonellosis.

1. INTRODUÇÃO

As galinhas caipiras brasileiras são originárias de cruzamentos aleatórios entre as diferentes raças trazidas ao país durante o período colonial. Mesmo que muitas destas raças tenham se perdido ao longo do tempo, algumas ainda são criadas no sistema caipira em diversas regiões brasileiras¹.

Os produtos de origem animal como ovos e carcaças de galinhas podem se constituir em fontes de veiculação de bactérias patogênicas, como as causadoras de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA), configurando como de grande interesse e preocupação para a saúde humana².

Pode ocorrer ainda a presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos, que vem se tornando um problema crescente em diversos países, além de ser classificada como de risco potencial para a saúde do consumidor, confirmado por resultados obtidos em várias localidades, comprovando o aumento da ocorrência de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos com ênfase em produtos avícolas³.

Infecções por *Salmonella* sp, são os maiores problemas em saúde pública no mundo, tanto pelos impactos sociais quanto pelos econômicos. Algumas espécies animais têm maior potencial para se manterem como reservatórios desta bactéria, em especial aves, estando disseminada em toda a cadeia produtiva. Sua ocorrência varia conforme o país, o tipo de produção. Os métodos de diagnóstico, que em conjunto promovem o conhecimento epidemiológico acerca desta enfermidade, que é de ocorrência mundial⁴.

As bactérias vivem no trato intestinal de animais infectados e humanos. No presente estudo, empregamos o método RCR para a triagem e identificação de sorotipos de *Salmonella* Enteritidis em peles de aves de capoeira de amostras comerciais no Irã (Sodagar, Najmeh and Moghaddam Matin, Maryam and Bahrami, Ahmad Reza)

Deteção de genes usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) requer sequências específicas conhecidas como iniciadores. Um primer serve como ponto de partida para o DNA replicação, ligação específica do oligonucleotídeo para a sequência alvo em o fio do modelo é essencial para uma experimento bem sucedido. A ligaçãoA especificidade de um iniciador é determinada por várias de suas propriedades, como o derretimento temperatura (T_m), conteúdo de GC e auto-complementaridade. A criação de primers é geralmente feito com a ajuda do computador programas, entre os quais o Primer3 está entre o mais utilizado. DETECTION OF VIRULENCE GENES *phoP* AND *phoQ* IN *Salmonella* spp. USING IN SILICO POLYMERASE CHAIN REACTION.

A PCR apresenta diversas vantagens, pois combina velocidade e facilidade de execução, além de alta especificidade e sensibilidade.

A detecção precoce da infecção por *Salmonella* é possível usando várias técnicas moleculares incluindo a reação em cadeia da polimerase (PCR), essas técnicas moleculares são eficientes em identificar o próprio patógeno e não atingir os anticorpos produzidos pelo patógeno. No entanto, esta seção destacará as técnicas moleculares, excluindo a PCR. Antigenic cross reactivity and molecular profiling of *Salmonella* species recovered from enteric sources.

Desta forma, o presente estudo teve por objetivos pesquisar a presença de *Salmonella* spp, de genes de resistência aos antimicrobianos em excretas, ovos e carcaças de galinha caipira comercializadas em feiras livres na cidade de Goiânia, Goiás,

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Detectar por PCR a presença de *Salmonella* spp. e de genes de resistência a antibióticos em amostras de excretas, carcaças e ovos caipiras comercializados em feiras de Goiânia, Goiás, Brasil.

2.2. Específicos

Detectar *Salmonella* sp., em amostras de excretas, carcaças e ovos caipiras comercializados em feiras de Goiânia, Brasil, por meio da PCR.

Detectar os genes *bla*_{TEM}, e *qnrS*, *aadA2*, que determinam a resistência à beta lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos, respectivamente, em amostras de excretas, carcaças e ovos caipiras comercializados em feiras de Goiânia, Brasil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

Foram coletadas 100 amostras de excretas, 100 de carcaças e 50 dúzias de ovos caipiras comercializados em 29, 54, 33 feiras respectivamente, no município de Goiânia-GO, no período de julho de 2017 a outubro de 2018.

As amostras de excretas foram colhidas com o uso de colheres descartáveis, estéreis por meio de irradiação ultravioleta, e acondicionadas em embalagens estéreis tipo *stomacher*, mantidas sob refrigeração em caixas isotérmicas. As carcaças foram acondicionadas e mantidas em caixas isotérmicas também sob refrigeração. Os ovos foram adquiridos e mantidos em temperatura ambiente. Todas as amostras foram colhidas ao acaso e encaminhadas ao Laboratório de Bacteriologia do Setor de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

3.2. Pré-enriquecimento das amostras para PCR

Das carcaças foram retiradas 25g de pele e músculo das regiões do pescoço e pericloacal e acondicionadas em embalagem plástica estéril contendo 225 mL de água peptonada tamponada a 1%, com posterior incubação a 37°C por 24 horas.

As excretas foram pesadas e adicionado o volume de nove vezes o peso da amostra de água peptonada tamponada a 1%, com posterior incubação a 37°C por 24 horas.

Para análise dos ovos foi procedida a separação das três estruturas (casca, albúmen e gema), antes de quebrar a casca foi utilizada solução de álcool a 70 °GL para a sanitização externa. Após a sanitização o ovo foi quebrado em placa de Petri estéril, a casca armazenada em Becker e o albúmen foi retirado com auxílio de seringa de 20mL e posto em Becker e a gema em um terceiro Becker. Desta forma se compuseram três *pools*, sendo um de cada estrutura. Foram pesados 25g de casca, aliquotados 25mL de albúmen e 25mL de gema e adicionados individualmente em 225 mL de água peptonada tamponada a 1%, com posterior incubação a 37°C por 24 horas.

Após esse período, 0,1 mL foi transferido para tubo de ensaio contendo 10 mL do caldo de enriquecimento seletivo Rappaport (Rappaport-Vassiliadis), e 1mL para 9 mL do caldo Selenito-Cistina, incubando 37°C por 24 horas.

Do caldo Selenito Cistina foram aliqüotados 2mL em *ependorfe* e congelados para a realização da PCR.

3.3. Extração de DNA

O DNA total foi isolado por meio do *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* (PROMEGA), seguindo orientações do fabricante.

Para se realizar a PCR foi quantificado o DNA presente nas amostras extraídas com o uso do aparelho nanodrop. Após a quantificação houve necessidade de diluição de amostras para se obter a quantidade de 10 a 100 ng de DNA/5 µL. A diluição foi realizada utilizando água ultrapura autoclavada. Realizada no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás.

3.4. Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

3.4.1. Detecção do gene *invA*

Para a identificação de *Salmonella* spp., foi utilizado o protocolo descrito por Rahn et al⁵, com algumas modificações. As reações de PCR tiveram um volume total de 50 µL, composto por 25 µL de *TaqMan™ Environmental Master Mix 2.0* (Applied Biosystems) 5,0 µL (10 pmol) de cada *primer*, 10,0 µL água ultrapura autoclavada e 5,0 µL da amostra de DNA em concentração variando de 10 a 50 pmol/ µL. A reação da PCR foi realizada em termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems). As combinações de tempo e temperatura para desnaturação inicial 72°C por 7 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 53 °C por 40 seg, extensão a 72°C por 3 min e incubação final a 72°C por 7 min. Em seguida foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2% com 2 µL de brometo de etídio em 100 mL de gel. A documentação fotográfica foi realizada em aparelho Gel Doc XR+ Imaging System (BioRad). A sequência de bases dos oligonucleotídeos do gene *invA*. *Foward*– GTGAAATTATCGCCACGTTCTGGGCAA. *Reverse* – TCATCGCACCGTCAAGGAACC. *Amplicon* possuindo 284pb. Como controle positivo foi utilizado DNA extraído da cepa de referência de *Salmonella* Enteritidis ATCC 14028.

3.4.2. Detecção do gene *bla*_{TEM}

Com base no protocolo definido por Colom et al (2003)⁶, a identificação do gene *bla*_{TEM} que codifica a resistência aos beta lactâmicos, para a amplificação utilizou-se mistura final com 25 µL contendo 0,2 mM de cada deoxynucleosídeo trifosfato (dNTP), 14 mM Tris-HCl (pH 8.4), 35 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1,5 mM de primer OXA-1, 1 mM de *primer bla*_{TEM} e 0,5 mM de *primer SHV primers*, 1U de Taq DNA polymerase e 2 µl da amostra de DNA. Para controle negativo foi utilizada uma mistura sem adição de amostras, para o positivo foram incluídos os produtores de lactamase (SHV-1, TEM-2 e OXA-1). O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Para a amplificação do DNA foi utilizado o termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems), com 32 ciclos com desnaturação a 94 °C por 30 s, anelamento a 54 °C por 30 s, e extensão a 72 °C por 1min. Esta ciclagem foi precedida por uma desnaturação a 94 °C por 5 min e etapa final a 72 °C por 10 min. *bla*_{TEM}: *Foward*– ATCAGCAATAAACCAGC. *Reverse* – CCCCGAAGAACGTTTTTC. *Amplicon* 516pb.

3.4.3. Detecção do gene *qnrS*

Para detecção do gene *qnrS*, o qual confere resistência às quinolonas, foi utilizado o volume final 30 µl, marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos no protocolo de amplificação do DNA, com desnaturação inicial 96 °C por 5 min; 30 ciclos de desnaturação a 96 °C por 30 s, anelamento a 53 °C por 30 s, e extensão a 72 °C por 1 min, e extensão final por 5 min a 72 °C. Sequenciamento do gene *qnrS*- *Foward* - ACGACATTCGTCAACTGCAA; *Reverse* - TAAATTGGCACCCTGTAGGC; com *amplicon* de 417pb⁷.

3.4.4. Detecção do gene *aadA*₂

A PCR foi realizada para identificação do gene *aadA*₂ que confere resistência aos aminoglicosídeos, conforme descrito por Walker et al (2001)¹⁴ que confere resistência aos aminoglicosídeos utilizando como volume final 25 µl contendo 2,0 µL de *template* de DNA, 2,5 µL de 10X PCR *buffer*, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM of dNTPS, 2,0 mM de cada *primer* e 1,0 unidade de enzima Taq DNA polimerase. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho

dos fragmentos obtidos. As condições da amplificação foram 5 min a 95°C, 32 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento 64°C por 1 min, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 5 min, temperatura interna do termociclador a 10°C; termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems)⁸. *Amplicon* de 432 bp. *aadA*₂ –
Foward: GGCGCGATCAACGAATTTATCCGA

Reverse: CCATTCGATGCCAAGGAACGAT.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR, utilizando o par de *primers* que codifica o gene *invA*, gerou um produto de 284 pb, o que confirmou a presença de *Salmonella* spp. nas 14 amostras igualmente positivas na bacteriologia convencional (Figura1) sendo seis amostras de carcaças positivas (38-41-105-227-232-234); cinco de excretas positivas (27-129-137-152-188); em uma das amostras de *pool* de ovos com as três estruturas (126cas-126alb-126ge).

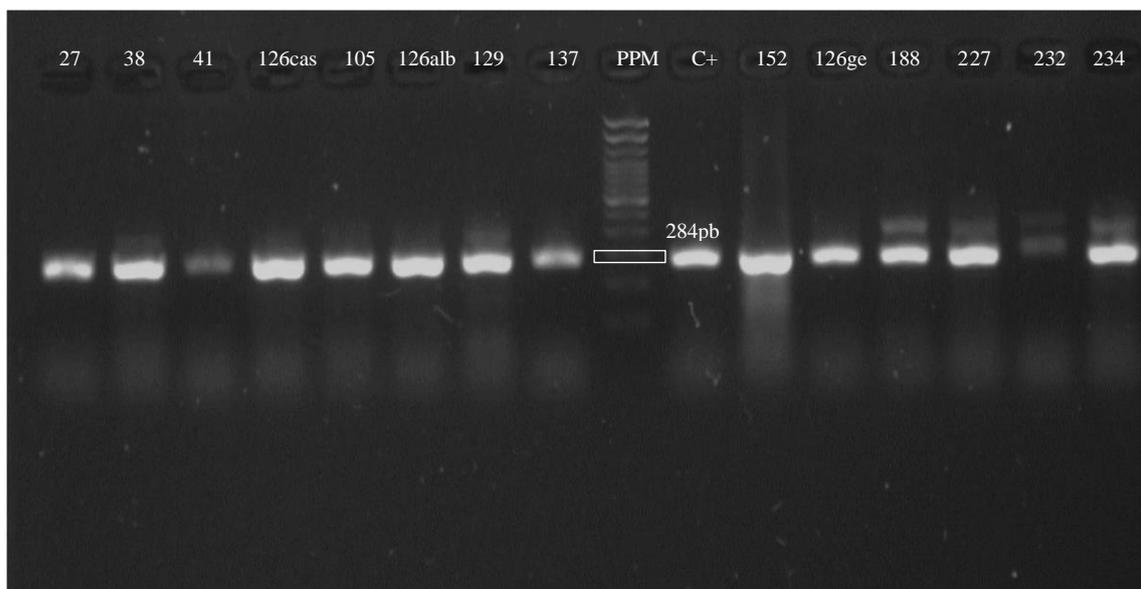


Figura 1: Gel de agarose mostrando produto da PCR dos genes *invA*, *Salmonella* sp. C+: Controle Positivo. PPM: Padrão de Peso Molecular (100pb).

Além da confirmação das amostras positivas em bacteriologia convencional, foi identificada a presença do gene *invA* em outras amostras, conforme figuras 2 e 3.

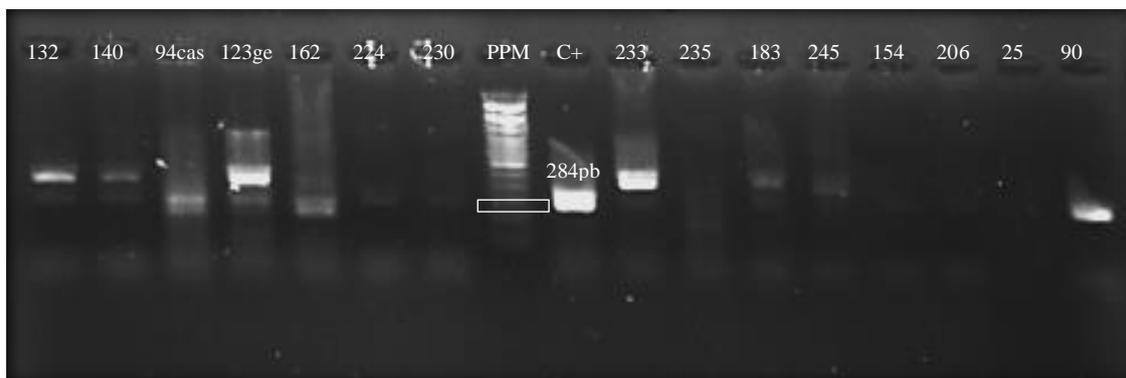


Figura 2: Gel de agarose mostrando produto da PCR dos genes *invA*, *Salmonella* spp. C+: controle Positivo. PPM: Padrão de Peso Molecular (100pb).

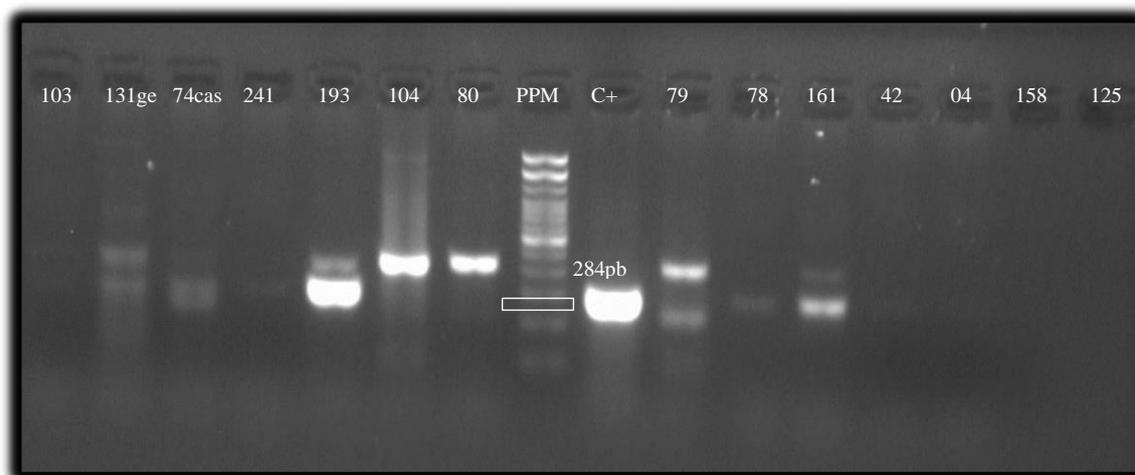


Figura 3: Gel de agarose mostrando produto da PCR dos genes *invA*, *Salmonella* sp. C+: controle Positivo. PPM: Padrão de Peso Molecular (100pb)

As amostras positivas na PCR, em *pool* das estruturas de ovos (74 e 94); carcaça (78) e excretas (90, 161, 162 e 193) foram negativas pela bacteriologia convencional. A detecção de *Salmonella* pela PCR em ovos, carcaças e excretas foi de 3,33% (5/150), 7% (7/100) e 9% (9/100) respectivamente.

Os resultados deste trabalho são discordantes com os obtidos em diferentes países referente ao isolamento em carcaças de frangos produzidos no sistema intensivo como o observado por Cardinale et al.,⁹ que obtiveram índice de detecção de 96% de *Salmonella* no Senegal, e por Molero¹⁰ em 2012, na Venezuela que identificou positividade em 60% das amostras de carcaças. Elevados índices de detecção em produtos oriundos do sistema intensivo têm sido justificados pelo processamento da carcaça no abatedouro e no resfriamento que ocorre por imersão em água, diferindo do processamento individualizado na produção caipira.

Por outro lado, em 2001, Zhao et al.¹¹, identificaram 4,2% para *Salmonella* spp., nos Estados Unidos enquanto que no Vietnam, Ta et al.¹⁰, detectaram 8,3% em carcaças de galinhas caipiras comercializadas e ao ar livre. Em sistemas de produção e comercialização similares aos deste estudo foram obtidos índices semelhantes de detecção pela técnica da PCR, além de serem países economicamente similares, a produção tem o mesmo objetivo, subsistência familiar.

A ocorrência de 13,33% identificada por Sarmiento (2016)¹² no Brasil, alerta para o papel fundamental dos manipuladores e da responsabilidade que os consumidores têm no que se relaciona com o controle e a redução da incidência de *Salmonella* sp., em

carcaças de frangos comercializadas em supermercados. Esta responsabilidade deve ser compartilhada e assegurada por meio de órgãos reguladores e fiscalizadores como a vigilância sanitária.

Com relação aos isolados de *Salmonella* sp., deste trabalho, quatro dos 21 (19,05%) foram positivos para o gene *bla*_{TEM}, sendo um isolado de carcaça e três de excretas uma vez que nos ovos não foram encontrados.

Na Dinamarca, o nível de resistência à ampicilina, que é um beta lactâmicos, por *Salmonella* de isolados de produtos de origem animal tem sido monitorado por quase uma década tendo tido observada a resistência à ampicilina em *Salmonella* Typhimurium provenientes da avicultura industrial próximo a 15%, enquanto para isolados de *Salmonella* Enteritidis de aves caipiras foi de 4%¹³. Desta forma o índice superior encontrado neste trabalho pode estar relacionado com o fácil acesso que os proprietários de aves caipiras tem aos antimicrobianos, o que pode estar contribuindo para a elevação do índice em contraste ao apresentado por Olesen et al (2004)¹³.

Quanto à pesquisa do gene *bla*_{TEM} em 21 isolados de *Salmonella* spp., sendo sete de carcaças, nove de excretas e cinco de ovos, foram identificados quatro isolados positivos para o referido gene sendo um de carcaça (4,76%), três de excretas (14,29%), o gene *bla*_{TEM} não foi identificado em nenhum dos isolados de ovos.

Cloeckaert et al.¹⁴, pesquisaram em 66 isolados de *Salmonella* spp., provenientes de carcaças de aves, na Bélgica em 2005, a presença de genes de resistência ao cloranfenicol, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas e antibióticos β -lactâmicos. Entre 26 isolados resistentes a β -lactâmicos, foram identificados os genes b-lactamase *bla*_{TEM} -1, *bla*CTX-M-65, *bla*CTX-M-15 e *bla*PSE-1, sendo que o gene *bla*_{TEM}-1 apresentou a maior ocorrência (69,2%, 18/26) entre isolados resistentes a β -lactâmicos no Egito¹⁵. Este índice mais elevado que o encontrado nesta pesquisa, podendo ser atribuído à forma de produção naquele país, uma vez que há menor regulamentação quanto ao comércio de antimicrobianos para a produção animal.

Em estudo desenvolvido por Kamel et al.⁴, no Egito, em 2018, foi constatado, em produtos avícolas, 8,33% (25/300) de positividade para a *Salmonella* sp. por métodos microbiológicos e moleculares e que todos os isolados foram positivos para ESBL. A pesquisa do gene da resistência *bla*_{TEM} demonstrou presença em todos os isolados de *Salmonella* sp., das carcaças analisadas. Nesta pesquisa foram analisadas apenas amostras

de carcaças, ovos e excretas do sistema caipira, que embora se tenha fácil acesso aos antibióticos o uso é menor que em produções industriais como o pesquisado no Egito. Mas em ambos têm a preocupação com a aquisição deste gene de resistência pelo homem, durante o contato com animais e seus produtos.

Gottapu e Suresh¹⁶, em pesquisa realizada na Índia em 2019, analisaram 21 isolados de *Salmonella* spp., dos quais 15 foram resistentes a antibióticos β -lactâmicos como ceftriaxona (33,33%), cefotaxima (28,57%), aztreonam (23,80%) e ceftazidima (23,80%), sendo que o gene *bla*_{TEM} foi detectado em 73,33% (11/15). Tais cepas de *Salmonella* spp., representam problemas de saúde significativos em todo o mundo em virtude da aquisição de resistência contra a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, que foram amplamente usados; embora tenha sido identificado menor ocorrência em produtos de galinha caipira a vigilância aos aspectos de resistência a este grupo de antibióticos deve permanecer como estratégias para sua redução e controle.

Quanto à família de genes *qnr*, codifica uma proteína de repetição do pentapeptídeo que protege a topoisomerase IV da inativação de quinolona e fluorquinolona. Foi identificada a presença em dois isolados de carcaças (9,52%) e em três de excretas (14,29%) totalizando cinco isolados positivos (23,81%), neste trabalho. Considera-se que plasmídeos contendo *qnrS* podem ser transferidos¹⁷ entre bactérias através de conjugação e este é um problema de saúde pública emergente muito importante¹⁸.

Embora o gene *qnrS* confira resistência de baixo nível à quinolona, mutações na Região Determinante de Resistência à Quinolona - (QRDR), podem resultar em resistência de nível superior às fluorquinolonas, especialmente à ciprofloxacina. Zhou et al.¹⁹, em 2019, identificaram que 31,4% (11/35) dos 14 isolados resistentes ao ácido nalidíxico e 21 de perfil intermediário de *Salmonella* abrigavam gene *qnrS*, resultado semelhante ao encontrado neste estudo 23,81% (5/21). No entanto, há uma diferença quanto ao tipo de amostra, pois na China as amostras são do sistema intensivo, enquanto as de Goiânia do sistema caipira, o que reforça a necessidade de se aumentar o apoio tecnológico a esta classe de produtores.

Wong e Chen²⁰, identificaram genes de resistência às quinolonas presentes nos plasmídeos *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac* (6)-Ib-cr em 28,3% de isolados de *S. enterica* oriundos de produtos cárneos, comercializados ao ar livre, em Hong Kong. Embora tenham ampliado a gama de produtos analisados, obtiveram resultado similar ao deste

trabalho constatando que a dispersão gênica que pode ocorrer não apenas em produtos avícolas, mas nos demais produtos cárneos, uma vez que um dos principais fatores que promove a pressão seletiva é o uso indiscriminado de antibióticos na produção animal.

Os resultados da pesquisa do gene *aadA2* neste trabalho apresentou-se negativo para todos os 21 isolados de *Salmonella* spp., não sendo consistente com os resultados apresentados por Palarete et al.²¹, que identificaram o gene em 14,3% em pesquisa realizada em 2015, assim como os 12,7% em galinhas caipiras no ano de 2015 na China por Zhao et al.¹¹, ainda nos estudos de Melendez et al.²² que em 2010 identificaram o gene em 50% dos isolados de *Salmonella* e Alali et al.²³ em 2010 com ocorrência de 5,6% em galinhas criadas ao ar livre nos Estados Unidos. A maioria das galinhas caipiras produzidas no Brasil são criadas em pequenas produções para a subsistência familiar, o que tem interessado a saúde pública a aprofundar as pesquisas neste sistema de produção uma vez que surtos de *Salmonella* começam a ser associados às aves domésticas, uma vez que podem albergar o patógeno e o gene de resistência ser transmitido ao homem.

5. CONCLUSÃO

O gene *invA* está presente em isolados de *Salmonella enterica* oriundos de excretas, carcaças e ovos caipiras comercializados em feiras do Município de Goiânia-Go, Brasil, indicando a ocorrência do patógeno nas diferentes amostras pesquisadas.

Há presença dos genes *bla*_{TEM} e *qnrS* nos três produtos analisados e do gene *aadA*₂ apresentou resultado presente apenas nos isolados das carcaças e excretas.

Analisando os dados obtidos observa-se que há necessidade de intensificar o controle sanitário tanto na fase produtiva quanto na comercialização, com o objetivo de reduzir riscos à saúde do consumidor, uma vez que há circulação de *Salmonella* e de genes de resistência em produtos comercializados em feiras de Goiânia, Goiás.

6. REFERÊNCIAS

1. Almeida ECJ, Carneiro PLS, Wenceslau AA, Filho RVF, Malhado CHM. Características de carcaça de galinha naturalizada Peloco comparada a linhagens de frango caipira. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 2013;48:1517–1523.
2. Secretaria Estadual de Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica. Investigação epidemiológica de surtos. Método Epidemiológico de Investigação e Sistema de Informação Material. São Paulo. 2006;49p.
3. Johnson TJ, Hanning IB, Han J, Ricke SC, Foley SL, Nayak R. Population Dynamics of *Salmonella enterica* Serotypes in Commercial Egg and Poultry Production. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011;77:4273–4279.
4. Kamel NM, Farghaly EM, Shawky HM, Samir A. Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from poultry and poultry products in Egypt. *Bulg. J. Veterinary Med.* 2019. doi:10.15547/bjvm.2019-0084
5. Rahn K, Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galán JE, Ginocchio C, Curtiss R, Gyles C. Amplification of *invA* gene of *Salmonella* by Polymerase Chain Reaction (PCR) as a specific method for detection of *Salmonella*. *JMolecular Cell.* 1992:271–279.
6. Colom K, Pérez J, Alonso R, Fernández-Aranguiz A, Lariño E, Cisterna Ramón. Simple and reliable multiplex PCR assay for detection of blaTEM, blaSHV and blaOXA-1 genes in Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 223:147–151.
7. Domokos J, Kristóf K, Szabó D. Plasmid-mediated quinolone resistance among extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* from bloodstream infections. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 2016;63:313–323.
8. Doosti A, Mahmoudi E, Jami MS, Mokhtari-Farsani A. Prevalence of *aadA1*, *aadA2*, *aadB*, *strA* and *strB* genes and their associations with multidrug resistance phenotype in *Salmonella* Typhimurium isolated from poultry carcasses. *Thai J. Vet. Med.* 2016;46:691–697.
9. Domínguez C, Gómez I, Zumalacárregui J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 2002;72:165–168.
10. Luque I, Molero G, Huerta B, Gómez-Gascón L, Cardoso-Toset F, Montiel M, Tarradas C. Evaluacion de la calidad microbiológica de canales de pollo sacrificadas en el estado de Zulia (Venezuela): aplicación de la normativa vigente. *Real Acad. Ciencias Vet. Andalucía Orient.* 2012;25:173–190.
11. Zhao X, Ye C, Yang L, Wang T, Chang W, Gao Y. Prevalence and characteristics of *Salmonella* isolated from Free-Range Chickens in Shandong province, China. *Biomed Res. Int.* 2016;2016:6.
12. Sarmiento IAM. Universidade Estadual Paulista; Faculdade de Medicina Veterinária. [Tese]; 2016).
13. Olesen I, Hasman H, Aarestrup FM. Prevalence of β -lactamases among ampicillin-

- resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* 2004;10:334–340.
14. Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, Butaye P, Imberechts H, Bertrand S, Collard JM, Arlet G, Weill FX. Dissemination of an extended-spectrum- β -lactamase *bla*_{TEM-52} gene-carrying IncII plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007;51:1872–5.
 15. Ahmed AM, Shimamoto T, Shimamoto T. Characterization of integrons and resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from meat and dairy products in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* 2014;189:39–44.
 16. Gottapu GC, Suresh B. Multidrug resistance and ESBL profile of *Salmonella* serovars isolated from poultry birds and foods of animal origin. *Pharma Innov. J.* 2019;8:277–282.
 17. Cheung TKM, Chu YW, Chu MY, Ma CH, Yung RWH, Kam KM. Plasmid-mediated resistance to ciprofloxacin and cefotaxime in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in Hong Kong. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;56:586–9.
 18. Buchala FG, Ishizuka MM, Mathias LA, Berchieri Júnior A, Castro AGM, Cardoso ALSP, Tessari ENC, Kanashiro AMI. Ocorrência da reação sorológica contra *Salmonella Pullorum* em aves de ‘fundo de quintal’ do estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.* 2006;73:1–5.
 19. Li Y, Pei X, Zhang X, Wu L, Liu Y, Zhou H, Ma G, Chen Q, Liang H, Yang D. A surveillance of microbiological contamination on raw poultry meat at retail markets in China. *Food Control* 104, 99–104 (2019).
 20. Zhou M, Li X, Hou W, Wang H, Paoli G.C, Shi X. Incidence and characterization of *Salmonella* isolates from raw meat products sold at small markets in Hubei Province, China. *Front. Microbiol.* 2019;10:1–10.
 21. Palareti G, Legnani C, Cosmi B, Antonucci E, Erba N, Poli D, Testa S, Tosetto A. Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. *Int. J. Lab. Hematol.* 2016;38:42–49.
 22. Melendez SN, Hanning IB, Han J, Nayak R, Clement AR, Wooming A, Herrera P, Jones FT, Foley SL, Ricke SC. *Salmonella enterica* isolates from pasture-raised poultry exhibit antimicrobial resistance and class I integrons. *J. Appl. Microbiol.* 109, 1957–1966 (2010).
 23. Alali WQ, Thakur S, Berghaus RD, Martin MP, Gebreyes WA. Prevalence and distribution of *Salmonella* in organic and conventional broiler poultry farms. *Foodborne Pathog. Dis.* 2010;7:1363–1371.

CAPÍTULO 5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a realização da pesquisa foi percebida que há circulação de *Salmonella* sp em amostras de excretras, ovos e carcaças comercializadas em feiras livres de Goiânia, este fato é um alerta para os setores produtivos e de controle sanitário, como supermercados e propriedades de diferentes portes.

Quando se considera as pequenas propriedades, que em sua maioria produzem pequenos volumes de produtos avícolas, que normalmente são apenas suficientes para a subsistência, observa-se que há uma preocupação empírica com a qualidade do produto ofertado para a população.

Esta preocupação é alicerçada, principalmente no contato contínuo entre produtor/comerciante com o consumidor final, que por vezes vem à feira com o objetivo definido de adquirir apenas determinado produto de determinado comerciante. Essa fidelização acarreta no comerciante uma certa responsabilidade quanto à saúde do consumidor de seus produtos.

Em caso de haver qualquer alteração na confiança da relação de consumo, é evidente que ocorrerá também uma depreciação do produto comercializado, que neste caso são os produtos avícolas.

Destes produtos, tanto carcaças quanto ovos estão suscetíveis a estarem contaminados com *Salmonella* sp, e que este patógeno possa ocasionar danos ao consumidor, incluindo vômitos, diarreia, perda de produtividade assim como o rompimento da confiança.

Em caso de contaminação de *Salmonella* sp., pelo consumo de carcaças ou ovos, haverá uma redução na procura destes alimentos, impactando diretamente no orçamento familiar, uma vez que geralmente é o que compõe a maior parte da renda do núcleo produtivo.

Esta contaminação pode representar um alto risco para o consumidor no que se refere à dispersão de patógenos uma vez que as aves criadas no sistema caipira, são produzidas com acesso às áreas de pastejo o que dificulta o controle ou a erradicação de doenças.

Não apenas a presença do patógeno mas também a veiculação de genes que cofiram a resistência às diferentes classes de antibióticos, que podem ser utilizados tanto na medicina veterinária quanto na humana, dificultando o tratamento, causando perdas econômicas e prejuízos à saúde pública.

Desta forma a prevenção e controle e a prevenção da ocorrência de *Salmonella enterica* no sistema de produção de galinha caipira, envolvendo a pesquisa em excretas, carcaças e ovos pode contribuir de forma positiva para o conhecimento das características epidemiológicas deste patógeno.

Algumas ações preventivas podem ser adotadas para a redução da ocorrência do patógeno em produções caipiras, como a restrição de acesso de visitas, a redução da área de acesso que as aves têm no decorrer da produção, limitar ou instalar barreiras físicas que dificultem o acesso de animais domésticos, sinatrópicos e silvestres, uma vez que são reconhecidamente veiculadores de *Salmonella* sp.

Há necessidade de maiores incentivos para pesquisas direcionadas aos sistemas de produção alternativos como o caipira, o de fundo de quintal, as pequenas produções de subsistência assim como para os considerados de companhia (*pets*), uma vez que há impacto em saúde pública por meio dos surtos em humanos e a provável disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos, tanto para bactérias do mesmo gênero quanto as que compõem a microbiota intestinal humana e animal.