

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

***Salmonella* sp. EM OVOS E PATOS (*Cairina moschata*) de CRIAÇÕES
INFORMAIS**

Denizard André de Abreu Delfino
Orientador: Prof. Dr. Valéria de Sá Jayme EVZ – UFG

GOIÂNIA
2016



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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 **1. Identificação do material bibliográfico:** Dissertação Tese

1 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

Nome completo do autor: Denizard André de Abreu Delfino

Título do trabalho: "*Salmonella* sp. em ovos e patos (*Cairina moschata*) de criações informais"

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO

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 (a) autor (a)

Data: 04 / 11 / 2016.

DENIZARD ANDRÉ DE ABREU DELFINO

***Salmonella* sp. EM OVOS E PATOS (*Cairina moschata*) DE CRIAÇÕES
INFORMAIS**

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:

Etiopatogenia, epidemiologia, diagnóstico e controle das
doenças infecciosas e parasitárias dos animais

Orientadora:

Prof. Dr. Valéria de Sá Jayme EVZ – UFG

Comitê de orientação:

Prof. Dr. Maria Auxiliadora Andrade EVZ – UFG

Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares EVZ – UFG

GOIÂNIA

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Delfino, Denizard André de Abreu
Salmonella sp. EM OVOS E PATOS (Cairina moschata) de
CRIAÇÕES INFORMAIS [manuscrito] / Denizard André de Abreu
Delfino. - 2016.
xv, 74 f.

Orientador: Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme; co-orientadora Dra.
Maria Auxiliadora Andrade; co-orientador Dr. Guido Fontgalland
Coelho Linhares.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de
Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2016.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de tabelas.

1. Antimicrobianos. 2. Genes. 3. Anseriformes. 4. Sorologia. 5.
Patógenos. I. Jayme, Valéria de Sá, orient. II. Título.

CDU 639.09

ATA NÚMERO **238** DE DEFESA DE TESE DE **DOUTORADO** DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, REALIZADA POR **Denizard André de Abreu Delfino**. Às **08h30min** do dia **07/10/2016**, reuniu-se na Sala de Defesas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Campus II Samambaia, nesta Capital Goiânia - Goiás, a Comissão Julgadora infra nomeada para proceder ao julgamento da Defesa de Tese de Doutorado apresentado (a) pelo (a) Pós-Graduando (a) **Denizard André de Abreu Delfino**, intitulada "**Salmonella sp. em ovos e patos (Cairina moschata) de criações informais**", apresentada para obtenção do **Título de Doutor em Ciência Animal**, junto à Área de Concentração: **Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos** desta Universidade. O Presidente da Comissão Julgadora **Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme**, iniciando os trabalhos, concedeu a palavra ao (a) candidato (a) **Denizard André de Abreu Delfino** para exposição em **cinquenta** minutos do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos Examinadores, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o prazo máximo de **vinte** minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para responder aos Senhores Examinadores. Ultimada a arguição, que se desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu Julgamento, considerando o (a) candidato (a) **Aprovado (a) ou Reprovado (a)**:

Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

Aprova

Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

APROVADO

Profa. Dra. Maria Claudia Dantas P. B. André

Aprovado

Dra. Dunya Mara Cardoso Moraes

Aprovado

Profa. Dra. Cintia S. Minafra de Rezende

Aprovado

Em face do resultado obtido, a Comissão Julgadora considerou o (a) candidato (a) **Denizard André de Abreu Delfino**, Habilitado [(**Habilitado (a) ou não Habilitado (a)**)] pelo(s) motivo(s) abaixo exposto(s):

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da tese:

Título mantido

Nada mais havendo a tratar, eu **Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme**, lavrei a presente ata que, após lida e achada conforme foi por todos assinada.

Profa. Dra. Valéria de Sá Jayme

Prof. Dr. Marcelo Vasconcelos Meireles

Profa. Dra. Maria Cláudia Dantas P. B. André

Dra. Dunya Mara Cardoso Moraes

Profa. Dra. Cintia S. Minafra de Rezende



Maria Cláudia D. P. B. André
Dunya Mara Cardoso Moraes
Cintia S. Minafra de Rezende

Dedico à minha querida esposa e aos meus queridos filhos,
Claudia Regina Alencar dos Santos,
Lourdes Marina Alencar Delfino,
Rafael Alencar Delfino,
As minhas irmãs Déborah e Helvídia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus criador do céu e da terra e ao mestre Senhor Jesus Cristo pelos seus ensinamentos sobre perseverança e fé, que me deram forças para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

A minha esposa e companheira de todas as horas, pela sua força e fé inabalável, que me mantiveram de pé, mesmo com as forças enfraquecidas e mente cansada, sempre me fortalecendo com palavras confortantes.

A minha sogra Ana Alencar dos Santos, pela sua fé inabalável, nos seus 94 anos me adotou como filho. Obrigado por suas orações.

A minha orientadora Professora Doutora Valéria, de Sá Jayme, pela orientação, atenção e infinita paciência e presteza. Obrigado por confiar em mim.

A minha co-orientadora, Professora Doutora Maria Auxiliadora Andrade, pela serenidade, firmeza, conhecimentos e acima de tudo a longa amizade desde a graduação, onde por sua intervenção realizei meu estágio curricular na Clínica de Bovinos de Garanhuns-PE, em 1989, minha eterna professora (Auxiliadora), muito obrigado por tudo.

A Doutora Dunya Mara Cardoso Moraes (memória), pelas suas ponderações e orientações.

A professora Dra. Iolanda Aparecida Nunes, por sua presteza e atenção.

A colega de trabalho Ana Maria de Souza Almeida e a auxiliar de laboratório Médica Veterinária Cintia Lorena Rezende, pela excelente contribuição no laboratório.

A todos aos professores e técnicos da Escola de Veterinária e Zootecnia, que compartilharam todos os seus conhecimentos comigo durante a graduação e pós-graduação.

Ao meu ex-colega de trabalho no CCZ de Aparecida de Goiânia e atualmente um grande amigo e grande incentivador Doutor Leonardo Tomaz, da Agência Goiana de Defesa Agropecuária.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Patos (<i>Cairina moschata</i>)	4
2.2 <i>Salmonella</i> sp.	4
2.3 Resistência de <i>Salmonella</i> aos antimicrobianos	7
2.3.1. Formas de aquisição de genes de resistência	8
2.3.2 Elementos genéticos carreadores de genes	10
a) Plasmídeos	10
b) <i>Transposons</i>	10
c) <i>Integrans</i>	11
2.4. Principais Genes de Resistência aos antimicrobianos detectados em <i>Salmonella</i>	11
2.4.1 Gene <i>Int1</i>	12
2.4.2 Gene <i>Sul1</i>	12
2.5 Gene de detecção de <i>Salmonella</i> sp.	13
2.5.1 Gene <i>rfbJ</i>	13
2.6. Caracterização molecular	13
2.6.1 Soroaglutinação rápida (SAR)	14
3. Objetivo geral	15
REFERÊNCIAS	16
CAPÍTULO 2. DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> sp. EM PATOS (<i>Cairina moschata</i>) E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL SANITÁRIO DE CRIAÇÕES INFORMAIS	22
RESUMO	22
1. INTRODUÇÃO	24
2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.1 Local	26
2.2 Caracterização das Propriedades	26
2.3 Amostragem	27
2.4. Pesquisa de <i>Salmonella</i> sp. pela bacteriologia convencional	27
2.5 SAR	28
2.6 Análises Estatísticas	28

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS.....	37
CAPÍTULO 3. PESQUISA DE <i>Salmonella</i> sp., TESTE DE SUSCETIBILIDADE E DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM OVOS DE PATAS (<i>Cairina moschata</i>)	40
RESUMO.....	40
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Local.....	45
2.2.1 Amostragem	45
2.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> pela análise bacteriológica	45
2.4. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos	46
2.5. Detecção dos genes <i>Int1</i> , <i>Sul1</i> e <i>rfbJ</i> pela técnica da PCR em tempo real .	47
2.6. Análises estatísticas	48
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
4. CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO 04 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
ANEXO I.....	68
ANEXO II.....	70
ANEXO III.....	73

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO - 2

TABELA 1: Variáveis utilizadas na caracterização do perfil produtivo e sanitário de 38 propriedades informais de criação de patos no Estado de Goiás e no Distrito Federal28

TABELA 2: Resultados do teste de soroglutinação rápida em placa SAR, para detecção de anticorpos anti-*Salmonella* em populações de anseriformes em 38 propriedades rurais estudadas.....32

CAPÍTULO - 3

TABELA 1: *Salmonella* em amostras colhidas em propriedades e feiras.....48

TABELA 2: Sorovares identificados em ovos de patas de acordo com a origem das coletas.....49

TABELA 3: Distribuição dos sorovares de *Salmonella* por estrutura dos ovos.....50

TABELA 4: Suscetibilidade a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* obtidos de ovos de patas oriundos de propriedades e feiras.....51

TABELA 5: Distribuição dos padrões de resistência a 15 antimicrobianos testados em isolados de *Salmonella* em estruturas de ovos de patas53

TABELA 6: Distribuição dos genes de resistência em cepas isoladas *Salmonella* de ovos de patas.....55

TABELA 7: Distribuição regional dos genes *Int11*, *Sul1* e *rfbJ* em sorovares de *Salmonella* isolados de ovos de patas oriundos de propriedades informais e feiras do Estado de Goiás e do Distrito Federal.....57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal

AMO - Amoxicilina

AMP - Ampicilina

CEUA - Comissão de Ética em Experimentação Animal

CFL.-. Cefalotina

CIP - Ciprofloxacina

CLO - Cloranfenicol

CS - Selenito Cistina

CT - Ceftiofur

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DVA'S - Doenças de vinculação hídrica

ENO - Enrofloxacin

EVZ - Escola de Veterinária e Zootecnia

FIOCRUZ - Fundação Osvaldo Cruz

FLF- Florfenicol

FO - Fosfomicina

FU - Furazolidona

GEN - Gentamicina

IgG - Imunoglobulina tipo G

IgM - Imunoglobulina tipo H

NEO - Neomicina

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PNSA - Programa Nacional de Sanidade Avícola

qPCR - Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real

RV - Rappaport Vassiliadis

S - Estreptomicina

SAR - Soroaglutinação Rápida

SINAN - Sistema Nacional de Informação de Agravos

SFM - Sistema fagocítico mononuclear

SUL - Sulfonamidas

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TET - Tetraciclina

TRI - Trimetoprim

TSI - Tríplice Açúcar ferro

UFC - Unidade Formadora de Colônias

UFG - Universidade Federal de Goiás

RESUMO

A pesquisa foi feita com o objetivo de investigar a presença de *Salmonella* sp. em suabes de cloaca e nos ovos de patas oriundos de 38 criações informais e de 38 feiras livres, além de detectar anticorpos anti-*Samonella* Gallinarum e Pullorum em soro sanguíneo destas aves, no Estado de Goiás e no Distrito Federal. Para determinação do perfil produtivo e sanitário destas propriedades que criavam patos foram aplicados 38 questionários compostos por 12 perguntas fechadas. Mediante as informações obtidas pelas respostas dos questionários aplicados durante as visitas, foi observado que as propriedades das regiões estudadas não apresentavam manejo produtivo e sanitário adequados. Foram colhidas 324 amostras de sangue total que foram utilizadas na prova Sorológica de Aglutinação Rápida em Placa (SAR), para detecção de anticorpos anti-*Salmonella* Pullorum e Gallinarum. Nesta prova 117/324 (36,1%) dos soros sanguíneos foram sororreagentes. Foram colhidas 324 suabes cloacais de patos e 912 ovos em 38 propriedades e 38 feiras, que foram subdivididos de acordo com a estrutura em *pool*, dando origem a 228 amostras de casca, 228 de albúmen e 228 de gemas, totalizando 684 amostras. Os suabes cloacais e ovos foram analisados por bacteriologia convencional para pesquisa de *Salmonella* sp. Foram obtidos 38 isolados, sendo 36 em ovos 36/684 (5,3%), onde os sorovares foram *Salmonella* Heidelberg, Schwarzengrund, forma antigênica O:9,12 e *Salmonella* Typhimurium e dois isolados de suabes de cloaca 02/324 (0,62%), sendo identificados os sorovares *Salmonella* Typhimurium e Hadar. A distribuição percentual dos sorovares isolados foi: 32/38 (84,2%) *Salmonella* Schwarzengrund, 3/38 (7,9%) *Salmonella* Typhimurium, 1/38 (2,6%) a forma antigênica O:9,12, 1/38 (2,6%) *Salmonella* Heidelberg e 1/38 (2,6%) *Salmonella* Hadar. Os 36 isolados de ovos e os dois de suabes cloacais foram submetidos aos testes de suscetibilidade a 15 antimicrobianos, nos quais se obteve a seguinte distribuição de resistência: 29/38 (76,3%) às sulfonamidas, 14/38 (36,9%) à enroflaxacina, 10/38 (26,3%) à amoxicilina, 7/38 (18,4%) à ampicilina, 7/38 (18,4%) à gentamicina, 6/38 (15,8%) ao cotrimoxazol, 6/38 (15,8%) à cefalotina, 6/38 (15,8%) ao trimetoprim, 03/38 (7,9%) ao ceftiofur, 05/38 (13,1%) a neomicina, 5/38 (13,1%) à tetraciclina, 5/38 (13,1%) à fosfomicina, 3/38 (7,9%) ao cloranfenicol, 2/38 (5,3%) à ciprofloxacina e 0/38 (0%) ao florfenicol. Os 36 isolados de *Salmonella* foram ainda submetidos a prova de PCR em tempo real, onde foram detectados os seguintes genes: *rfbJ* 33/35 (94,3%), o gene *Int1* foi de 07/35 (20%) e o gene *Sul1* foi de 06/35 (17,1%). Portanto, foi detectada a circulação de *Salmonella* em patos e seus ovos nas criações informais e feiras no Estado de Goiás e no Distrito Federal, assim como a confirmação de resistência aos antimicrobianos e detecção de genes de resistência. Estas informações são importantes para determinação de risco, tanto para sanidade avícola quanto para saúde pública.

Palavras-chave: antimicrobianos, genes, propriedades, PCR, resistência.

ABSTRACT

The survey was conducted in order to investigate the presence of *Salmonella* sp. in swabs of cloaca and duck eggs coming from 38 informal breeding sites and 38 markets, and to detect anti-*Salmonella Gallinarum* and *Pullorum* antibodies in blood serum of these birds, in the State of Goiás and the Federal Distrito. To determine the productive and sanitary profile of the farms where ducks are raised, we applied 38 questionnaires consisting of 12 closed questions. Through the information obtained by the responses to the questionnaires during the visits, we observed that the farms of the studied regions did not present adequate productive and sanitary management. We collected 324 whole blood samples were used in the test Serological Rapid Agglutination plate (SAR) to detect anti-*Salmonella pullorum* antibodies. In this test 117/324 (36.1%) blood sera were seropositive. We harvested 324 cloacal swabs from ducks and 912 eggs from 38 farms and 38 markets. The samples were subdivided according to the structure in pools, producing 228 eggshell samples, 228 albumen samples and 228 yolk samples, totaling 684 samples. Cloacal swabs and eggs were analyzed by conventional bacteriology for *Salmonella* sp. We obtained 38 isolates, 36 from eggs in 36/684 (5.3%), and the serovars were *Salmonella Heidelberg*, *Schwarzengrund*, antigenic form O: 9.12, and *Salmonella typhimurium*, and two isolates from cloaca swabs 02/324 (0.62%). The identified serovars were *Salmonella Typhimurium* and *Hadar*. The 36 isolates from eggs and two from cloacal swabs were submitted to susceptibility test to 15 antimicrobials, from which we obtained the following distribution of resistance: 29/38 (76.3%) to sulfonamide, 14/38 (36, 9%) to enrofloxacin, 10/38 (26.3%) to amoxicillin, 7/38 (18.4%) to ampicillin, 7/38 (18.4%) to gentamicin, 6/38 (15.8%) to cotrimoxazole, 6/38 (15.8%) to cephalothin, 6/38 (15.8%) to trimethoprim, 03/38 (7.9%) to ceftiofur, 05/38 (13.1 %) to neomycin, 5/38 (13.1%) to tetracycline, 5/38 (13.1%) to fosfomicin, 3/38 (7.9%) to chloramphenicol, 2/38 (5.3%) to ciprofloxacin, and 0/38 (0%) to florfenicol. The percentage distribution of the isolated serovars was: 32/38 (84.2%) *Salmonella Schwarzengrund*, 3/38 (7.9%) *Salmonella Typhimurium*, 1/38 (2.6%) the antigen form: 9.12, 1/38 (2.6%) *Salmonella Heidelberg*, and 1/38 (2.6%) *Salmonella Hadar*. The 36 isolates of *Salmonella* were also submitted to proof of real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) on which the following genes were detected: 33/35 (94.3%) for *rfbJ*, 07/35 (20%) for *Int1* gene, and 06/35 (17,1%) for *Sul1* gene. Therefore, we verified circulation of *Salmonella* in ducks and their eggs in informal rearing farms in the state of Goiás and in the Federal District, we also confirmed the antimicrobial resistance and detected resistance genes. This information is important for determining risk for both poultry and public health.

Keywords: antimicrobials, facilities, genes, PCR, resistance.

CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Os patos pertencem à ordem dos anseriformes e à família *Anatidae*, com distribuição por todos os continentes. São aves rústicas, de fácil adaptação às condições brasileiras, com raças variadas e aptidões distintas. Podem ser produtoras de ovos, de carne e/ou mista. São muito precoces, sendo que algumas espécies especializadas na produção de carne, podem atingir 2,5 kg aos 45 dias de idade, aproximadamente^{1,2}.

O aumento do comércio e do consumo de produtos avícolas em todo o mundo torna a qualidade e a segurança deste tipo de alimento uma questão relevante em saúde pública³. A criação de aves aquáticas tem aumentado ao longo dos anos em amplitude global, possivelmente em decorrência da elevação do consumo de carne e ovos de patos. Entretanto, estudos sobre a prevalência de patógenos nestas aves ainda são escassos⁴.

A venda da carne dessas aves tem crescido em média 5% ao ano no Brasil, sendo possível encontrar o produto congelado nos principais hipermercados nacionais. O mercado externo comprou, em 2014/2015, cerca de 11.857 toneladas de carne de patos industrializadas no País. Portanto, o mercado formal está em expansão, sendo o principal desafio aumentar a taxa de consumo da carne de pato pela população brasileira, que é de cerca de 20 gramas por habitante por ano, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal⁵.

O maior polo industrial de produção e abate de anseriformes (patos, marrecos e gansos) está localizado no Estado de Santa Catarina, responsável por mais de 60% da produção nacional. Outros Estados que se destacam na produção de aves aquáticas são o Paraná, com 15,56 %, Minas Gerais, com 7,29% e São Paulo, com 4,13%⁵. Segundo dados do último relatório anual da ABPA, ocorreu um incremento significativo na produção dessas aves (15,09% de patos e 0,82% de marrecos), passando de 2,5 toneladas em 2013, para 11,9 toneladas em 2015, demonstrando, assim, a importância das aves aquáticas na avicultura brasileira⁵.

Estima-se que 19.542 casos de enfermidades de origem alimentar ocorreram em 2014 na América do Norte e nos países que compõem a União Europeia. As infecções causadas por *Salmonella* sp. foram a segunda maior causa das doenças zoonóticas em 2012 na Europa, atrás apenas da campilobacteriose, com 91.034 casos

confirmados e 61 óbitos⁶⁻⁹, destacando-se como fontes de contaminação os ovos e seus derivados, principalmente a maionese caseira¹⁰.

Já no Brasil, segundo o Programa de Vigilância Epidemiológica de Doenças Transmitidas por Alimentos, em análise dos dados colhidos no Sistema Nacional de Informação de Agravos/Doenças (SINAN), foi possível identificar que nos anos de 2000 a 2015, os ovos, produtos à base de ovos, a carne de ave *in natura*, processados e miúdos, foram responsáveis por 1.055 surtos de enfermidades de origem alimentar em humanos. Contudo, a quantidade de surtos pode estar abaixo da realidade, considerando-se a provável subnotificação. Este cenário, reforça a necessidade de monitoramento dos produtos de origem avícola e sua importância em saúde pública¹¹.

Salmonelas são bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo que o gênero inclui mais de 2.659 sorovares, sendo composta por duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*¹². São bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, com cerca de 2 a 5 µm de comprimento por 0,7 a 1,5 µm de largura. Devido aos flagelos peritríquios, são móveis em sua grande maioria, no entanto, *Salmonella Gallinarum* e *Pullorum* são imóveis¹³.

Uma das enfermidades causadas por *Salmonella* é a salmonelose aviária, que provoca grandes perdas econômicas devido ao comprometimento do potencial produtivo das aves e que pode ocasionar elevada morbidade e mortalidade em aves jovens. A infecção nas aves pode originar três doenças: pulorose, cujo agente é a *Salmonella Pullorum*, tifo aviário, causado por *Salmonella Gallinarum* e paratifo aviário, causado por qualquer outro sorovar¹⁴.

Os antimicrobianos são substâncias químicas utilizadas no controle e/ou combate dos micro-organismos e podem ter ações inespecíficas, como os antissépticos e desinfetantes, ou específicas, como os quimioterápicos e antibióticos, sendo que estes últimos são comumente utilizados com fins terapêuticos, profiláticos ou como promotores de crescimento¹⁵.

Pelas características ainda selvagens dos anseriformes, maiores estudos se fazem necessários para o controle e a prevenção da transmissão de doenças por estas aves, em destaque para *Salmonella* sp., tanto para as criações industriais, como para os seres humanos. Neste sentido, o estudo das criações informais de patos pode auxiliar no mapeamento epidemiológico das áreas de maior ocorrência de doenças das aves aquáticas, bem como a identificação dos agentes etiológicos envolvidos e seus

reservatórios, principalmente considerando-se áreas com grande trânsito de seres humanos, animais e aves, como os anseriformes.

A identificação de sorotipos potencialmente patogênicos para humanos e para outras aves, indica que os anseriformes podem ser, como já registrado, importantes fontes de veiculação de patógenos em alimentos destinados ao consumo humano (carne e ovos de patas)¹⁶, indicando, assim, que programa de monitoramento em propriedades de patos se faz necessário para minimizar os riscos à saúde pública, assim como para a sanidade avícola.

O aumento crescente pela procura por patos e ovos em feiras e pontos comerciais e a expansão de criações informais, tem sido uma realidade no Estado de Goiás e Distrito Federal, tornando-se necessária a adoção pelos órgãos oficiais de medidas de controle mais eficiente na comercialização e no controle sanitário destas aves.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Patos (*Cairina moschata*)

Os patos domésticos são aves bem adaptadas às condições brasileiras e sua criação vem sendo difundida em todo Brasil, pela facilidade de manejo principalmente em propriedade de pequeno porte. A maioria das criações são de subsistência, sendo que os ovos e as aves excedentes da produção são vendidos nas feiras ou pequenos comércios próximos aos locais de criação¹⁷.

Quando comparados aos frangos, os anatídeos parecem ser efetivamente mais resistentes às doenças e às condições climáticas, características estas que favorecem sua criação, tornando-a viável e acessível¹⁸.

Algumas enfermidades presentes em anseriformes, dentre elas a salmonelose, apresenta alto risco de transmissão para as aves comerciais e para o homem, tornando-se uma das maiores preocupações na saúde avícola e saúde pública¹⁹.

Contudo, as informações sobre os anseriformes no Brasil e nas regiões estudadas são escassas, principalmente em relação a *Salmonella* sp. nos patos e nos ovos oriundos de criações informais ou comercializados nas feiras, observando-se a necessidade de maiores pesquisas que auxiliem na determinação do perfil epidemiológico e sanitário destas regiões.

2.2 *Salmonella* sp.

Salmonella é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*, Gram negativa, em forma de bastonetes, não formadora de esporos, que em sua maioria possui motilidade pela presença de flagelo, são aerogênicas, não fermentadoras de lactose, oxidase negativa, urease negativa e utilizadora de citrato, entre outros que inclui mais de 2.659 sorotipos, entre os quais 1.586 pertencem à subespécie *enterica*¹². O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A primeira é subdividida em seis subespécies: *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, *salame*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* e a segunda possui 23 sorotipos^{12,20}.

Além de subespécies, *Salmonella* ainda é subdividida em sorovares conforme critérios de tipagem estabelecidos por Kaufmann-White. Cerca de 90 sorovares são incriminados em casos de infecções em humanos e animais. O sorovar Typhimurium, por exemplo, consegue infectar e causar doença em grande diversidade de hospedeiros como bovinos, suínos, aves e roedores²¹.

O método mais empregado para a identificação destes biótipos é a fagotipagem (ou Definitive phage types – DT). Diferentes biótipos dentro de um mesmo sorovar de *Salmonella* já foram identificados. Neste método, a partir de um painel de teste com bacteriófagos adequados, pode-se identificar mais de 300 fagotipos diferentes apenas em *Salmonella* Typhimurium, mas sabe-se que o mesmo método pode ser aplicado em *Salmonella* Enteritidis. Esta diferenciação em fagotipos pode ser usado para acompanhar a disseminação ou determinar o hospedeiro preferencial de um biótipo específico^{21,22}.

A salmonelose é uma zoonose de importância mundial, havendo ampla distribuição do gênero *Salmonella* entre animais, e sua permanência no ambiente contribui para que este micro-organismo assuma papel de importância em saúde pública²³. Estão amplamente difundidas na natureza, sendo capazes de infectar o trato intestinal de animais, tanto de sangue frio quanto de sangue quente, entre eles o homem^{22,24}.

Existem três categorias distintas utilizadas na classificação das salmoneloses, que se baseiam nas características próprias do hospedeiro acometido. Salmonelas altamente adaptadas ao homem, incluindo *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A, B e C (agentes da febre entérica); salmonelas altamente adaptadas aos animais como *Salmonella* Dublin (bovinos), *Salmonella* Pullorum e Gallinarum (aves) e finalmente as salmonelas zoonóticas, que incluem a maioria dos sorovares que acometem o homem e os animais e podem ser responsáveis por doenças de veiculação alimentar²⁵.

A epidemiologia da *Salmonella* sp. é bastante complexa, principalmente pelas formas de transmissão. Aves, mamíferos e répteis, além de poderem ser afetados, são carreadores em estado latente ou assintomático e todos podem excretar a bactéria pelas fezes, atuando como reservatórios e fonte de infecção para outros animais e seres humanos, assim como fonte de contaminação para o meio ambiente⁷. A principal forma de contaminação ocorre por meio de ingestão de alimentos contaminados com fezes contendo o agente, também sendo possível a infecção pelas vias aerógena e conjuntival²⁶.

Pela distribuição comopolita, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), *Salmonella* sp. é o agente bacteriano mais frequentemente 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^{27,28}.

Em aves, a primeira descrição documentada de salmonelose foi feita no ano de 1885. Com o tempo, diversos autores vêm isolando e identificando os diferentes sorovares do grupo, com maior incidência a *Salmonella enterica*, sorovar Typhimurium e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, sorovares particularmente responsáveis pelas toxinfecções alimentares no homem¹³.

De acordo com Deng et al.²⁹, os patos são susceptíveis a infecções por *Salmonella* Enteritidis e, em pesquisas desenvolvidas para avaliar a progressão da salmonelose, por meio da inoculação de cepas por via nasal em patos jovens, pode-se inferir que a quantidade de inóculo e a rápida replicação e disseminação nos órgãos está diretamente relacionada com a evolução da doença e a susceptibilidade de invasão e colonização se manifestam diferentemente dependendo da região do intestino. As aves podem não apresentar nenhum sintoma da doença, causando uma infecção inaparente e também, pode não se limitar ao intestino, estendendo-se aos órgãos internos, incluindo o sistema reprodutivo, com conseqüente contaminação de ovos utilizados para consumo humano.

Alguns estudos indicam que os patos são resistentes às infecções por *Salmonella* Pullorum e Gallinarum, possivelmente isso ocorre devido às características inerentes das bactérias, que dificultam sua multiplicação no sistema fagocítico mononuclear (SFM) dessas aves³⁰. Apesar de serem consideradas aves rústicas, os patos, em relação a outros anseriformes, apresentam maior incidência de salmonelose^{6,31}. Acredita-se que a maior incidência relaciona-se aos hábitos aquáticos, pois ao nadarem em mananciais possivelmente contaminados com dejetos de esgotos, podem contaminar-se com *Salmonella*¹⁰.

A enfermidade ocorre com maior frequência em patos domésticos do que em selvagens. As aves mais jovens, com sete dias de vida, são mais afetadas pela bactéria do que aquelas com idade acima de três semanas¹⁶.

Os sinais clínicos mais frequentes em patos são: tremores musculares, dificuldade respiratória, sendo que a morte pode ocorrer mais lentamente nos patos jovens do que em patos adultos. A salmonelose pode se instalar no período de formação dos ovos, quando há contaminação do ovário, e também depois do ovo formado, especialmente durante sua passagem pela cloaca, através da contaminação por fezes da ave infectada, ou ainda pela contaminação externa através de trincas na casca^{32,33}.

A contaminação por *Salmonella* em ovos se dá em sua maioria pela casca. Por isso, a desinfecção e o resfriamento do ovo logo após a postura são procedimentos adotados em vários países, como medida para reduzir a contaminação e a multiplicação bacteriana. Devido a presença de substâncias naturais como a lisozima, que é uma enzima antibacteriana e os baixos níveis de concentração de ferro necessários para o desenvolvimento da bactéria, o albúmen pode apresentar baixa contaminação por salmonelas^{10,22,34}.

A presença de sinais clínicos e a contaminação dos ovos é dose dependente, podendo não ocorrer manifestação da doença, no entanto, mesmo sem sinais aparentes pode ocorrer a produção de ovos contaminados. Chappell et al.³⁵ destacaram que doses de inóculos com maior Número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), juntamente com a produção de ovos contaminados, foi acompanhada de queda de postura e sinais clínicos de salmonelose em galinhas.

2.3 Resistência de *Salmonella* aos antimicrobianos

Após a descoberta da penicilina na Inglaterra, passaram-se poucos anos para que se registrassem os primeiros casos de micro-organismos resistentes a este fármaco: em 1940 foi identificada cepa de *Escherichia coli* produtora de β -lactamase¹⁵. 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 mundialmente³⁶.

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 ASSuTFu³⁶.

Após estas descobertas, em 1969 foi recomendado 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 Itália³⁷.

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 século³⁸. 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 ACGKSSuTTmNxCpl, que possui resistência a dez antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, gentamicina, kanamicina, estreptomicina, sulfonamida, tetraciclina, trimetoprim, ácido nalidíxico e perda de suscetibilidade ao ciprofloxacino³⁶.

De acordo com Pandini et al.³⁹, a resistência antimicrobiana constitui-se um tema bastante estudado em gêneros bacterianos pela possibilidade de transmissão para o homem. Dentre os gêneros responsáveis por zoonoses, destaca-se o gênero *Salmonella* por sua ampla ocorrência no homem e nos animais, sendo que as aves apresentam uma importância elevada na epidemiologia das salmoneloses entéricas.

2.3.1. Formas de aquisição de genes de resistência

Os genes de resistência podem estar presentes em diversas regiões do cromossomo e/ou elementos genéticos móveis da bactéria, sendo responsáveis pela codificação de resistência, que podem determinar a patogenicidade e conseqüentemente a virulência *Salmonella* sp.¹⁵

Por métodos bioquímicos e moleculares, o DNA de vários sorotipos de *Salmonella* enterica já foram sequenciados e caracterizados. As bactérias, que são micro-organismos de menor complexidade genética, possuem algo em torno de 500 genes compondo seu DNA, sendo conhecida a maioria das funções que cada gene determina para a bactéria. As funções que os genes possuem são vitais para a sobrevivência da bactéria, pois codificam proteínas funcionais para a respiração, locomoção, aquisição de nutrientes, invasão da célula hospedeira, resistência a determinados antimicrobianos e enterotoxinas, dentre outras⁴⁰. Portanto, a recombinação genética, que se refere à troca de genes entre duas moléculas de DNA

para formar novas combinações em um cromossomo, é considerada a fonte da variação evolutiva da maioria dos procariotos^{41,42}. Além disso, esse evento possui papel essencial na preservação da integridade genética por meio da reparação de possíveis falhas no DNA bacteriano⁴³.

As bactérias podem transferir o seu material genético de duas formas: através da transferência gênica vertical, os genes são passados diretamente aos seus descendentes, ou a transferência gênica horizontal, onde os genes podem ser adquiridos de outros micro-organismos da mesma geração. Esse fenômeno envolve uma célula doadora, que contribui com parte de seu genoma para uma célula receptora, que pode ser de uma espécie ou até mesmo de um gênero diferente⁴⁴. Após esta troca de material genético entre doadora e receptora, a nova unidade formada passa a ser denominada de recombinante, e o restante é degradado por enzimas⁴².

Após a aquisição horizontal dos genes, podem ocorrer efeitos deletérios à célula bacteriana que os recebeu, assim, essa bactéria será eliminada da população ao qual está inserida, devido às mutações deletérias, já que são eventos prejudiciais à sobrevivência do micro-organismo. Contudo, se os genes conferirem vantagem seletiva em relação ao hospedeiro, eles podem ser rapidamente espalhados dentro da população bacteriana⁴⁵.

A transdução, transformação e conjugação, são os mecanismos pelos quais é possível ser realizada a transferência gênica horizontal entre os micro-organismos⁴³⁻⁴⁷. Além das formas de transferência gênica anteriormente citadas, existem mecanismos adicionais que são chamados elementos genéticos móveis: plasmídeos, transposons e integrons, que podem proporcionar a sobrevivência dos micro-organismos^{38,48}.

De acordo com Hur et al.⁴⁹, a detecção do aumento de sorotipos multirresistentes pertencentes ao gênero *Salmonella* Typhimurium e Newport, tem sido alvo de pesquisas e vigilância epidemiológica por estarem relacionados à saúde pública. Dentre os sorotipos destaca-se o Typhimurium fagotipo DT 104, que tem causado grande preocupação na comunidade científica, por apresentar um agrupamento gênico codificado para perfil de resistência a cinco antimicrobianos: ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina – ACSSuT.

2.3.2 Elementos genéticos carreadores de genes

a) Plasmídeos

Os plasmídeos são pequenos elementos genéticos circulares extracromossomais, formados por cadeia dupla de DNA (com cerca de 1% a 5% do tamanho do cromossomo bacteriano), localizados no citoplasma da célula bacteriana que podem se replicar de forma independente. Variam em tamanho, mas geralmente não ultrapassam mais do que um décimo do tamanho do DNA cromossomal. Existem plasmídeos com estruturas simples, como os plasmídeos conjugativos que possuem os genes para proceder à conjugação bacteriana, e plasmídeos complexos, que carregam uma grande variedade de genes que em alguns casos podem ser importantes para a sobrevivência da bactéria hospedeira¹⁵. Segundo Rotger e Casadesús⁵⁰, a maioria dos sorovares de *Salmonella enterica* não possui plasmídeos. Contudo, estão presentes nos sorovares frequentemente associados às infecções humanas e de animais de criação, como *Salmonella* Enteritidis, Pullorum, Gallinarum, Dublin, Typhimurium e Abortus-ovis. Possuem de cinco a cem genes que não são vitais à sobrevivência da célula em condições normais, sendo perdidos e adquiridos sem causar dano, mas que conferem vantagens como a codificação de tolerância a metais pesados e resistência a antibióticos⁴².

Os plasmídeos possuem fatores R (resistência) e os fatores F (fimbriais). O fator R se relaciona à habilidade de intermediar a transferência de resistência a antimicrobianos entre bactérias que são resistentes para outras que não são. Normalmente carregam um grupo de genes responsáveis pela resistência, cuja função é inativar a ação de determinada droga. Os plasmídeos R, como exemplo R1 e R100, são responsáveis por controlar o processo de replicação e conjugação, denominados fatores de transferência de resistência⁵¹.

b) Transposons

Os transposons, chamados de “genes saltadores”, são segmentos de DNA e recebem este nome por possuírem a capacidade de mudar sua localização no genoma do organismo, este processo é denominado transposição. Podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou plasmídeo. Transposons simples, chamados de sequências de inserção (SI), têm somente genes necessários a incorporação em novos locais associados a rearranjo genético no gênero. Nos transposons complexos está inserido

material genético adicional que são os genes adicionais, não relacionados com a transposição, responsáveis pela sobrevivência durante a terapia antimicrobiana¹⁵.

c) Integrons

Integrons são estruturas gênicas, com tamanho e distribuição variável, capazes de captar cassetes gênicos, convertendo-os em genes funcionais. Já os cassetes gênicos, são elementos móveis livres, com estruturas formadas pela associação entre um gene e um sítio de recombinação específica para uma integrase. Quando esta enzima (codificada pelo gene *int1* presente no integron) atua juntamente com o sítio de recombinação denominado *attI*, é possível ocorrer recombinação sítio-específica e conseqüentemente a inclusão ou exclusão, de cassetes nos integrons. Além disso, eles parecem desempenhar papel importante na transmissão de resistência a antibióticos entre bactérias Gram negativas por meio de conjugação⁵².

2.4. Principais Genes de Resistência aos antimicrobianos detectados em *Salmonella*

Resistência bacteriana é um termo utilizado para se referir aos micro-organismos que não são inibidos por quantidades usualmente empregadas de substâncias antimicrobianas, ocorrendo a partir de um processo multifatorial bastante complexo. As bactérias com o objetivo de perpetuar sua espécie têm como ferramenta principal a aquisição de resistência aos antimicrobianos⁵³.

A aquisição de resistência aos antimicrobianos pelas bactérias pode ocorrer de duas formas: o tipo natural (quando o micro-organismo é naturalmente resistente a alguns antimicrobianos, pois os genes que possui codificam a ausência de estruturas ou mecanismos celulares necessários à atuação do fármaco); ou o tipo adquirido por meio de mutações ou pela transferência dos genes de resistência entre bactérias³⁸.

Dentre as duas formas de aquisição de resistência, a forma adquirida é a de maior importância para a sanidade animal e saúde pública, pois diferentemente da resistência natural, não pode ser detectada pelos profissionais sem antes solicitar a realização de exames laboratoriais⁴².

São conhecidos quatro mecanismos bioquímicos de resistência bacteriana: por destruição ou inativação enzimática da droga (como a enzima β -lactamase); por redução da absorção do antibiótico; por alterações no sítio-alvo do fármaco e, finalmente, por efluxo do antibiótico⁵⁴.

De acordo com Threlfall³⁶, estudos preliminares sugeriram que todo o mecanismo de resistência de um micro-organismo estaria codificado nos cromossomos do agente. Posteriormente, com o uso de técnicas moleculares, foi possível confirmar esta afirmação quando se detectou que estas características estavam ligadas a genes específicos como, por exemplo, o gene *Int1* e *Sul1*.

2.4.1. Gene *Int1*

De acordo com Hsu et al.⁵⁵, a detecção do gene *int1*, que indica a presença do integron de classe 1, relaciona-se ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana em *Escherichia coli* e *Vibrio cholera*. Neste gene estão alojados a maioria dos cassetes de genes que promovem a resistência aos antimicrobianos, responsável por promover resistência às sulfonamidas. A detecção do gene *int1* está intimamente relacionada à presença da Ilha Genômica 1 de *Salmonella* (SGI 1). Cinco classes de integrons são identificados³⁷. Verificou-se ainda que a classe 1 integron tem papel importante no fator de multirresistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas⁵⁶. Foram identificados mais de 100 cassetes de genes diferentes transportados por integron de classe 1³⁷.

2.4.2. Gene *Sul1*

Um papel fundamental na disseminação da resistência antimicrobiana em *Salmonella* tem sido atribuído à classe 1 e à classe 2 dos integrons na resistência a sulfonamidas em bacilos Gram-negativos. Três genes de resistência às sulfonamidas foram detectados em *Salmonella*¹⁵. Geralmente a aquisição de resistência ocorre quando surge qualquer um dos dois genes *sul1* e *sul2*, formas de codificação de dihidropteroato sintase que não são inibidos pelo fármaco⁵⁷. O gene *sul1* é normalmente encontrado ligado a outro gene de resistência e faz parte do segmento conservado 3' (3'CS) de integrons de classe 1. O gene *Sul2* encontra-se ligado com os genes *str* (que conferem resistência à estreptomicina) geralmente localizado em pequenos plasmídeos não conjugados ou relacionado à transmissão de multirresistência. Destaca-se ainda o gene *sul3* plasmídeo à base de sulfonamida, também responsável por resistência.

2.5 Gene de detecção de *Salmonella* sp.

2.5.1 Gene *rfbJ*

Os genes *rfbJ* codificam a sintase glicosilo e enzimas de transferase de antígeno “O” polissacarídeo, que são enzimas envolvidas na síntese de abequose (um açúcar presente no antígeno “O”) e confere especificidade antigênica em *Salmonella* do grupo B.

De acordo com estudo de Shanmugasundaram et al.⁵⁸, foi utilizado o PCR monoplex para identificar *Salmonella* Typhimurium a partir de amostras de água e alimentos, onde os genes alvos eram *invA*, *ironB*, STM4497, STM2755, *fliC* e *rfbJ*, onde a partir desta sequência, o gene *rfbJ* foi utilizado como método de detecção de *Salmonella* nestes testes, que em adição com genes de amplificação STM4497, STM2755, conseguiram identificar dois dos sete isolados bioquimicamente de suspeito de serem *Salmonella*.

Segundo os mesmos autores, quando converteram o PCR monoplex em multiplex usando os mesmos genes anteriores descritos em dois formatos simultâneos conseguiram identificação do género *Salmonella*, o grupo *Salmonella* entérica o sorogrupo, *Salmonella* Typhimurium. Portanto, a técnica PCR, tornou-se uma alternativa em diagnósticos microbiológicos devido a sua simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e especificidade.

O gene *rfbJ* codifica a sintase de CDP-abequose necessárias para a biossíntese antígeno (O4). Portanto, através do PCR o gene *rfbJ* foi detectado em todos os padrões de *Salmonella* Typhimurium, Abony e dois das sete estirpes suspeitas de *Salmonella*⁵⁹.

2.6. Caracterização molecular

A partir da descrição da estrutura do DNA na década de 50, através das técnicas de biologia e engenharia molecular ocorreu um incremento no sequenciamento genético, sendo possível rastrear o aparecimento de genes em bactérias proximamente relacionadas. Por apresentar alta variabilidade genética, *Salmonella* é um importante objeto de estudos nessa área, dentre os vários gêneros bacterianos existentes⁶⁰.

Os métodos genotípicos se baseiam na detecção de genes de resistência, que é feita através de métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) ou PCR quantitativo (ou em tempo real - qPCR)⁶¹.

Após o sequenciamento dos produtos amplificados durante a PCR, para se conhecer o arranjo gênico de cassetes, os resultados devem ser alinhados e confirmados utilizando informações disponíveis em bancos de dados genéticos, como o GenBank database⁶¹.

A utilização da técnica de PCR representou um avanço tecnológico, através de diagnóstico rápido e automatizado. Além destas citadas vantagens, as técnicas de amplificação do ácido nucléico apresentam, ainda, otimização na utilização de amostras clínicas, com pequenas quantidades de micro-organismos, elevadas sensibilidade, especificidade e segurança no diagnóstico⁶¹.

2.6.1 Soroaglutinação rápida (SAR)

A sorologia é uma metodologia laboratorial que visa o estudo e a mensuração das reações antígeno-anticorpo, medindo a resposta específica do organismo frente a um determinado antígeno.

O teste SAR é uma prova simples para monitorar o estado de saúde de plantéis avícolas de fácil execução, baixo custo e os resultados são de rápida obtenção. Este teste tem sido utilizado para identificação de aves portadoras ou que sofreram infecção prévia, em muitos países⁶². O teste detecta imunoglobulinas tipo IgG e IgM, mas principalmente IgM formadas a partir do terceiro ao décimo dia ou mais da infecção. Estas imunoglobulinas são constituídas a partir do reconhecimento das células de defesa do hospedeiro aos antígenos presentes na parede celular das bactérias (LPS)^{63,64}.

Diante do exposto, considerando a importância do patógeno, a crescente demanda de ovos para consumo humano e o risco que estes ovos podem representar para a saúde pública, foi desenvolvido o presente estudo, com a finalidade de identificar *Salmonella* sp., em patos de criações informais e ovos comercializados em feiras livres e propriedades rurais no Estado de Goiás e Distrito Federal.

3. Objetivo geral

Caracterizar algumas propriedades que criavam patos;

Investigar a presença de *Salmonella* sp. em patos (*Carina Moschata*) e ovos em criações informais e em feiras no Estado de Goiás e no Distrito Federal;

Realizar o teste SAR;

Realizar o teste de suscetibilidade a 15 antimicrobianos utilizados na linha veterinária e humana;

Detectar genes de resistência nos isolados de ovos de patas das regiões estudadas;

Fornecer subsídios aos órgãos de defesa agropecuária no sentido de ampliação da caracterização de novas propriedades na região contemplada, contribuindo ainda com a sanidade avícola, produção animal e saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Dean WF, Sandhu TS. Health Management in home textiles ducks. Cornell University College of Veterinary Medicine Ithaca, New York. 2014;2(2):232-43.
2. Meulen CJ, Dikken G. Criação de patos nas regiões tropicais: Agrodok Wageningen: Fundação Agromisa; 2003. 96 p.
3. Labunska I, Harrad S, Santillo D, Johnston P, Yun L. Domestic duck eggs: an important pathway of human exposure to PBDEs around e-waste and scrap metal processing areas in Eastern China. *Environ Sci Technol*. 2013;47(16):9258-66.
4. da Silva EE, de Souza Lopes E, de Castro Teixeira RS, de Albuquerque ÁH, da Rocha RC, Gomes Filho VJR, Vasconcelos RH, Maciel WC. Pesquisa de enterobactérias em patos domésticos (*Cairina moschata*) de propriedades localizadas em quatro municípios do Ceará, Brasil. *Arq Inst Biol*. 2014;81(1):16-21.
5. Associação Brasileira de Proteína Animal. ABPA. Relatório anual 2014/2015. Brasília; 2015.
6. Le Hello S, Hendriksen RS, Doublet B, Fisher I, Nielsen EM, Whichard JM, Bouchrif B, Fashae K, Granier SA, Jourdan-Da Silva N. International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infect Dis*. 2011;204(5):675-84.
7. Tang T, Cheng A, Wang M, Li X, He Q, Jia R, Zhu D, Chen X. Development and clinical verification of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of *Salmonella* species in suspect infected ducks. *Poult Sci*. 2012;91(4):979-86.
8. CDC. Centers for Disease Control. Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006–2013. Morbidity and Mortality Weekly Report. 2014;63(15):328-32; 2014.
9. European Food Safety Authority E, ECDC. Scientific Report of EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks. *EFSA Journal*. 2014;12(2):35-47.
10. Kudakwashe M, Dionne R, Grietjie DK, Karen HK, H. K, Francis D. Incidence of Nontyphoidal *Salmonella* in Food-Producing Animals, Animal Feed, and the Associated Environment in South Africa, 2012–2014 *Clin Infect Dis*. 2015;61(S4):283–9.
11. Brasil. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília Editora do Ministério da Saúde v.1; 2014.

12. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, De Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill F-X. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 2014;165(7):526-30.
13. Flament A, Soubbotina A, Mainil J, Marlier D. Prevalence of *Salmonella* serotypes in male mule ducks in Belgium. *Vet Rec.* 2012;170(12).
14. Batista DFA, Neto OCF, Barrow PA, de Oliveira MT, Almeida AM, Ferraudo AS, Berchieri Jr A. Identification and characterization of regions of difference between the *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum and the *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum genomes. *Infect Genet Evol.* 2015;30:74-81.
15. Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Robberts AP. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.* 2011;2:1-27.
16. Cha SY, Kang M, Yoon RH, Park CK, Moon OK, Jang HK. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates in Pekin ducks from South Korea. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36(5):473-9.
17. Bějček V, Stastný K. Enciclopédia das Aves: as várias espécies e seus habitats. Lisboa: Livros & Livros; 2008. 55 p.
18. Fabichak I. Criação doméstica de patos, marrecos e perus. São Paulo-SP, Editora Nobel: NBL Editora; 1999.
19. Xu J, Yin Z, Li L, Cheng A, Jia R, Song X, Lu H, Dai S, Lv C, Liang X. Inhibitory effect of resveratrol against duck enteritis virus in vitro. *PloS one.* 2013;8(6):e65213.
20. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PAD, Weill F-X. Supplement 2003–2007 (No. 47) to the white-Kauffmann-Le minor scheme. *Res Microbiol.* 2010;161(1):26-9.
21. Kim H, Lee J, Jang Y, Chang B, Kim A, Choe N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from ducks in Korea. *Korean J Vet Res.* 2016;56(2):91-5.
22. Suo B, He Y, Tu S-I, Shi X. A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157, and *Listeria monocytogenes* in meat products. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(6):619-28.
23. Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeisen J. *Salmonella* pathogenicity and host adaptation in chicken-associated serovars. *Microbiol Mol Bio Rev.* 2013;77(4):582-607.
24. Li R, Lai J, Wang Y, Liu S, Li Y, Liu K, Shen J, Wu C. Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *Int J Food Microbiol.* 2013;163(1):14-8.

25. Berchieri Júnior A, Silva EN, di Fabio J, Sesti L, Zuanaze MAF. Doenças das aves. 2 ed. Campinas; 2009. 1104 p.
26. Flament A, Soubbotina A, Mainil J, Marlier D. Prevalence of *Salmonella* serotypes in male mule ducks in Belgium. *Vet Rec.* 2012 Mar;170(12):311. PubMed PMID: 22266688. eng.10.1136/vr.100156.
27. Borsoi A, Santos LRd, Rodrigues LB, Moraes HLdS, Salle CTP, Nascimento Vpd. Behavior of *Salmonella heidelberg* and *Salmonella enteritidis* strains following broiler chick inoculation: evaluation of cecal morphometry, liver and cecum bacterial counts and fecal excretion patterns. *Braz J Microbiol.* 2011;42(1):266-73.
28. WHO. World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance; 2014. 257 p.
29. Deng SX, Cheng AC, Wang MS, Ye LG. Quantitative analysis of *Salmonella* Enteritidis loads in ducklings after nasal inoculation. *Poult Sci.* 2009;88(9):1888-92.
30. Berchieri Júnior A. Controle de Salmoneloses mostra resultados no combate ao tifo aviário. *Informativo Técnico Avícola - Biovet*, n 42; 2012.
31. Su Y-C, Yu C-Y, Lin J-L, Lai J-M, Chen S-W, Tu P-C, Chu C. Emergence of *Salmonella* enterica serovar Potsdam as a major serovar in waterfowl hatcheries and chicken eggs. *Avian Dis.* 2011;55(2):217-22.
32. Shivaprasad HL. Fowl typhoid and pullorum disease. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2000;19(2):405-24.
33. Beam A, Garber L, Sakugawa J, Koprál C. *Salmonella* awareness and related management practices in US urban backyard chicken flocks. *Prev Vet Med.* 2013;110(3):481-8.
34. Forshell LP, Wierup M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2006;25(2):541-54.
35. Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2009;128(1):53-9.
36. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food-and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev.* 2002;26(2):141-8.
37. Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):388-96.

38. Yang B, Zheng J, Brown EW, Zhao S, Meng J. Characterisation of antimicrobial resistance-associated integrons and mismatch repair gene mutations in *Salmonella* serotypes. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;33(2):120-4.
39. Pandini JA, Pinto FGS, Muller JM, Weber LD, Moura AC. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* sp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arq Inst Biol*. 2015;20:1-6.
40. Rezk NA, Mansour H, Ghoneim NH, Rifaat MM. Typing of *Salmonella* Typhi strains isolated from Egypt by RAPD PCR. *3 Biotech*. 2012;2(1):17-25.
41. Didelot X, Maiden MCJ. Impact of recombination on bacterial evolution. *Trends Microbiol*. 2010;18(7):315-22.
42. Tortora G, Funke B, Case C. *Microbiologia*. 10^a ed. Porto Alegre: Ed. Artmed: Artmed; 2012. 894 p.
43. Conley EC. Mechanism and genetic control of recombination in bacteria. *Mutation Research, Amsterdam*. 1992;284:75-96.; 1992.
44. Bauman RW. *Microbial Genetics*. In: *Microbiology*. 2.ed. San Francisco: Pearson; 2009.
45. Thomas CM, Nielsen KM. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2005;3(9):711-21.
46. Porwollik S, McClelland M. Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microbes Infect*. 2003;5(11):977-89.
47. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6):S3-S10.
48. van Elsas JD, Bailey MJ. The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol*. 2002;42(2):187-97.
49. Hur J, Jawale C, Lee JH. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Res Int*. 2012;45(2):819-30.
50. Rotger R, Casadesús J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol*. 2010;2(3):177-84.
51. Shahada F, Amamoto A, Chuma T, Shirai A, Okamoto K. Antimicrobial susceptibility phenotypes, resistance determinants and DNA fingerprints of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolated from bovine in Southern Japan. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;30(2):150-6.
52. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(4):757-84.

53. Mota RA, da Silva KPC, de Freitas MFL, Porto WJN, da Silva LBG. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. *Braz J Vet Res Anim Sci.* 2005;42(6):465-70.
54. Veldman K, Cavaco LM, Mevius D, Battisti A, Franco A, Botteldoorn N, Bruneau M, Perrin-Guyomard A, Cerny T, Escobar CDF. International collaborative study on the occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolated from animals, humans, food and the environment in 13 European countries. *J Antimicrob Chemother.* 2011:dkr084.
55. Hsu YM, Tang CY, Lin H, Chen YH, Chen YL, Su YH, Chen DS, Lin JH, Chang CC. Comparative study of class 1 integron, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various *Salmonella* serovars from humans and animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36(1):9-16.
56. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(8):608-20.
57. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):836-9.
58. Shanmugasundaram M, Radhika M, Murali HS, Batra HV. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of fliC, fljB, iroB, invA, rfbJ, STM2755, STM4497 genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;25(8):1385-94.
59. Salehi TZ, Mahzounieh M, Saeedzadeh A. Detection of invA gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR method. *Int J Poult Sci.* 2005;4(8):557-9.
60. Liu W-b, Liu B, Zhu X-n, Yu S-j, Shi X-m. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing. *Food Microbiol.* 2011;28(6):1182-9.
61. Bugarel M, Granier SA, Weill F-X, Fach P, Brisabois A. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *BMC microbiol.* 2011;11(1):1.
62. De Oliveira GH, Berchieri Júnior Â, Montassier HJ, Fernandes AC. Assessment of serological response of chickens to *Salmonella Gallinarum* and *Salmonella Pullorum* by Elisa. *Rev Bras Cienc Avic.* 2004;6(2):111-5.
63. Barrow PA, Berchieri Jr A, Al-Haddad O. Serological response of chickens to infection with *Salmonella gallinarum* - *S. pullorum* detected by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.* 1992:227-36.
64. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária .Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003. Aprovam as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella*

Pullorum e Livres ou Controlados para Salmonella enteritidis e para Salmonella Typhimurium. Brasília; 2003. 499p.

CAPÍTULO 2. DETECÇÃO DE *Salmonella* sp. EM PATOS (*Cairina moschata*) E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL SANITÁRIO DE CRIAÇÕES INFORMAIS

RESUMO

A criação de patos (*Cairina moschata*) tem sido intensificada nos últimos anos, devido à maior procura e ao consumo da carne destas aves. As bactérias do gênero *Salmonella* podem acometer as criações avícolas e apresentam caráter zoonótico, representando riscos à sanidade avícola e à saúde pública. Os objetivos desta pesquisa foram a caracterização de 38 propriedades com criação de patos quanto ao perfil produtivo e sanitário, sorologia de *Salmonella* através da prova sorológica de aglutinação rápida em Placa (SAR), para detecção de sororreagentes e a pesquisa bacteriológica em suabes cloacais de aves oriundas destas criações para detecção de *Salmonella* sp.. Após análise dos questionários aplicados durante as visitas às propriedades, foi observado que 32/38 (84,2%) das criações tinham características de subsistência e 06/38 (15,8%) tinham finalidade comercial ou criação ornamental. A criação geralmente era consorciada com galinhas. O pato era a espécie de anseriforme mais criada em 38/38 (100%) dos locais visitados. Em relação à quantidade de patos por propriedade, em 21/38 (55,3%) destas foram classificadas com até 20 aves, 14/38 (36,9%) tinham entre 21 a 40 patos, 1/38 (2,6%) de 41 a 80 patos e em 2/38 (5,3%) tinham acima de 80 aves por criação. A maior parte das propriedades 29/38 (76,3%) tiveram até cinco aves mortas nos seis meses que antecederam a pesquisa e quando estas mortes ocorriam não havia nenhuma preocupação com o destino das aves, sendo que em 19/38 (50,0%) das propriedades as carcaças eram enterradas ou apenas descartadas em locais afastados. O milho era utilizado em 34/38 (89,5%), o capim em 28/38 (73,7%), a alimentação caseira em 25/38 (65,8%) e a ração comercial em 12/38 (31,6%), contudo, as rações utilizadas eram balanceadas para alimentação de frangos e galinhas. A origem da água utilizada nas criações, em sua maioria, era de fontes naturais 32/38 (84,2%), a reposição do plantel era feita com patinhos da própria propriedade 38/38 (100%) e em 36/38 (94,7%) a incubação era natural. Em relação ao controle de parasitas, 29/38 (76,3%) dos proprietários não faziam nenhum controle de endo e ectoparasitas. Os abrigos eram rústicos em 11/38 (28,9%) das propriedades e em 20/38 (52,7%) os patos eram criados soltos. Foram colhidas amostras de sangue, para pesquisa de anticorpos anti-*Salmonella* Pullorum e Gallinarum através da prova SAR. A frequência de aves sororreagentes pelo teste SAR foi de 117/324 (36,1%) nas 38 propriedades pesquisadas. Foi realizado o exame bacteriológico em suabes cloacais de 324 patos. *Salmonella* sp. foi isolada em 02/324 (0,62%) dos suabes cloacais de patos destas propriedades. Os sorovares foram identificados pela Fundação Oswaldo Cruz (RJ), sendo um isolado de *Salmonella* Typhimurium 01/38 (2,6%) e outro de *Salmonella* Hadar 01/38 (2,6%). Conclui-se que, as propriedades informais avaliadas não apresentam manejo higiênico, sanitário e nutricional adequados. Nestas propriedades existem patos sororreagentes para *Salmonella* com baixo isolamento em suabes cloacais.

Palavra-chave: anseriformes, anticorpos, diagnóstico, propriedades, sorologia.

CHAPTER 2. DETECTION OF *Salmonella* sp. IN DUCKS AND CHARACTERISTICS OF HEALTH PROFILE IN INFORMAL BREEDING SITES

ABSTRACT

Anseriformes production has been enhancing considerably in recent years due the increased demand and consumption of duck meat. *Salmonella* can affect poultry farm and have zoonotic risks to animal and public health. The objectives of this study were to microbiologically characterize 38 duck farms by the serological rapid agglutination on plate (SAR) and bacteriological research of cloacal swabs of ducks. The analyses of questionnaires showed that in 32/38 (84.2%) of the breeding sites had subsistence purpose and 06/38 (15.8%) had commercial or ornamental purpose. The farms usually produced chicken as well. Ducks were anseriformes most frequently raised (100%) in the sites visited. Regarding the amount of ducks, 21/38 (55.3%) farms had 20 birds or less, 36.9% had between 21 and 40 ducks, 2.6% had 41-80 ducks, and 5.3% had over 80 birds. Most of the farms (76.3%) had up to five dead birds in the six months preceding the survey and when these deaths occurred there was no diagnosis, and in 19/38 (50,0%) farms, the carcasses were buried or just discarded in remote locations. As for feed, corn was used in 34/38 (89.5%) of the farms, grass in 28/38 (73.7%), home feed in 25/38 (65.8%), and a commercial feed in 12/38 (31.6%); however, in these farms the rations were balanced to feed both broilers and hens. The water used in duck farms came mostly from natural sources (84.2%), animal's replacement was made with ducklings from the own property 38/38 (100%), and 36/38 (94.7%) farms, incubation was natural. In relation to parasite control, 29/38 (76.3%) of owners carried out none. Shelters were rustic in 11/38 (28.9%) of farms and in 20/38 (52.7%) ducks were set loose. Blood samples were collected for the detection of anti-*Salmonella pullorum* antibodies by Serological Rapid agglutination on plate (SAR). The frequency of farms with seropositive birds by SAR test was 117/324 (36.1%). We conducted a bacteriological examination in cloacal swabs of 324 ducks. *Salmonella* sp. was isolated in 02/324 (0.62%) of cloacal swabs from ducks coming from these properties. Oswaldo Cruz Foundation identified the serotypes. One serotype was identified as *Salmonella* Typhimurium (2.6%) and the other as *Salmonella* Hadar (2.6%). We concluded that the informal farms evaluated do not have adequate sanitary and nutritional management, and we verified the presence of seropositive ducks for *Salmonella* with low levels of isolates in cloacal swabs.

Keyword: anseriformes, antibodies, diagnosis, farms, serology.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, assim como em alguns países do noroeste da Ásia, a criação de anseriformes encontra-se em expansão desde os anos 80, devido à maior procura e ao consumo da carne de pato nos últimos anos. A espécie de pato (*Cairina moschata*), é a mais criada no Brasil, popularmente conhecida como pato comum, que é proveniente de cruzamentos com a raça europeia Muscovy e o gigante alemão, de cor branca^{1,2}.

Ressalta-se que o controle sanitário na avicultura industrial é realizado através de rigorosas medidas de bioseguridade e do monitoramento constante das aves. O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), criado em 1994, preconiza o monitoramento nos plantéis de reprodução para certificação de núcleos e granjas avícolas como livres de *Salmonella* em todo território nacional. Entretanto, nenhum controle é realizado em criações de aves em pequenas propriedades de subsistência, em destaque para os patos que podem ser fontes de infecção de *Salmonella* sp. para as aves industriais que se localizam próximas a estas propriedades.

A detecção de *Salmonella* sp. pode ser realizada através de vários testes, dentre eles destacam-se análise microbiológica e testes de biologia molecular⁴. O PNSA recomenda para monitoramento dos plantéis, a detecção de anticorpos anti - *Salmonella* por meio de provas de SAR e micro aglutinação como testes de monitoramento e a técnica de análise microbiológica como teste de diagnóstico confirmatório, possibilitando o isolamento e identificação de *Salmonella* por esta prova³.

O teste SAR é utilizado para monitorar os plantéis avícolas, sendo de fácil execução, baixo custo e os resultados são de rápida obtenção. Este teste tem sido utilizado para identificação de aves portadoras ou que tiveram infecção prévia, em muitos países⁴. O teste detecta imunoglobulinas tipo IgG e IgM, mas principalmente IgM formadas a partir do terceiro ao décimo dia ou mais da infecção. Estas imunoglobulinas são constituídas a partir do reconhecimento das células de defesa do hospedeiro aos antígenos presentes na parede celular das bactérias (LPS)^{5,6}. A desvantagem do SAR é que as imunoglobulinas podem reagir de forma cruzada com antígenos compartilhados por outras bactérias Gram-negativas, motivo pelo qual resultados falsos- positivos podem ocorrer principalmente com as salmonelas paratíficas do grupo D, tais como *Salmonella* Enteritidis e Panama⁷, o que tem contribuído para a falta de segurança no diagnóstico das salmonelas, principalmente quando utilizada isoladamente⁸. Portanto, apesar da utilização em larga escala da prova SAR na triagem

das aves, a detecção de aves sororreagentes não pode ser interpretada como infecção, sendo sempre recomendada a realização de testes confirmatórios como cultura bacteriológica ou testes moleculares, para identificação do organismo infectante⁴.

Assim, esta pesquisa foi desenvolvida visando avaliar as principais características das propriedades de criações informais no Estado de Goiás e no Distrito Federal, com ênfase ao monitoramento das aves por meio do SAR e o diagnóstico bacteriológico, com o objetivo de detectar e identificar patos sororreagentes para *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum*, bem como pesquisar a bactéria em suabes cloacais destas aves.

2. MATERIAL E METÓDOS

Este estudo foi realizado após a aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Goiás (CEUA), protocolo 001/15 (ANEXO I). Foram utilizados 38 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO II), contendo informações a respeito do estudo, identificação dos pesquisadores, finalidade da pesquisa, os quais foram assinados pelos proprietários que forneceram os anseriformes para pesquisa e responderam aos questionários (ANEXO III).

2.1 Local

Os testes de soroaaglutinação (SAR) e as análises bacteriológicas foram realizadas nos Laboratórios de Bacteriologia e de Sorologia do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás.

2.2 Caracterização das Propriedades

As propriedades foram identificadas mediante informações colhidas nas feiras, em casas de revenda de aves e casas de venda de produtos agropecuários.

Para a determinação das características de propriedades no Estado de Goiás e no Distrito Federal que criavam patos foram aplicados questionários (ANEXO III), em 38 propriedades visitadas, com perguntas sobre o manejo produtivo e sanitário dos patos. Após esclarecimento e consentimento dos proprietários, foram aplicados os referidos questionários.

O questionário aplicado aos proprietários ou responsáveis pela criação era composto por 12 perguntas fechadas, de múltipla escolha, contendo questões sobre diversos aspectos da criação, como: 1. Finalidade da criação, 2. Espécies de aves que eram criadas, 3. Número de patos por propriedade, 4. Número de aves mortas nos seis meses anteriores, 5. Tipo de alimentação utilizada na criação, 6. Origem da água utilizada na alimentação das aves, 7. Sistema de aquisição dos patinhos para reposição do plantel, 8. Tipo de incubação utilizada, 9. Destino das aves mortas, 10. Tipo de controle de endoparasitas, 11. Tipo de controle de ectoparasitas e 12. Tipos de abrigos utilizados.

2.3 Amostragem

Foram obtidas um total de 324 amostras de suabes cloacais e 324 amostras de sangue, totalizando 684 amostras de patos oriundos de criações domésticas no Estado de Goiás e no Distrito Federal. Após capturadas pelos proprietários e colaboradores, as aves foram contidas e colhidas as amostras de sangue, assim como suabes cloacais.

Foram utilizados suabes esterilizados, que só eram retirados de suas embalagens originais no momento da sua utilização. A coleta foi realizada por fricção na mucosa da cloaca. Os suabes foram acondicionados em tubos de vidro com tampa de rosca, contendo 10 mL de água peptonada a 1%, já identificados com o número da propriedade e da amostra.

A coleta de sangue foi realizada por punção da veia ulnar cutânea ou da veia jugular, com utilização de agulhas e seringas esterilizadas, descartáveis de 5 mL sem anticoagulante. O excesso de penas foi retirado e em seguida procedida a assepsia com álcool iodado. O volume de sangue colhido foi de 3 a 5 mL, dependendo do tamanho da ave, a colheita foi realizada do lado esquerdo do pescoço, pela maior facilidade de punção da veia jugular. O sangue foi mantido na seringa em repouso até o início da retração do coágulo, com uma inclinação de 45° e em seguida enviado ao Laboratório de Sorologia da EVZ/UFG, onde foi realizada a centrifugação para a separação do soro, que foi mantido refrigerado em micro tubos por até 24 horas para realização da prova SAR.

2.4 Pesquisa de *Salmonella* sp. pela bacteriologia convencional

As amostras de suabes cloacais logo após a coleta, foram transportadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável até o laboratório. Após a chegada das amostras no laboratório, iniciaram-se as análises com a incubação a 37°C/24 hs.

Em sequência foram homogeneizadas e 1 mL foi transferido para 9 mL de caldo selenito cistina (CS) e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV), seguindo-se incubação a 37°C por 24h. Após este período de incubação, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas foram plaqueadas por esgotamento em superfície para os ágaros XLT4, Hektoen e verde brilhante e novamente incubado a 37°C/24hs. Unidades Formadoras de Colônias (UFC), com características morfológicas de *Salmonella*, foram selecionadas e três a cinco UFC, por placa, foram individualmente transferidas para tubos contendo tríplice açúcar ferro (TSI) e incubadas a 37°C/24hs. As

culturas em TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidas ao teste de urease, produção de indol, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste do malonato e citrato de Simmons⁹.

Quando as provas bioquímicas eram compatíveis com *Salmonella*, as amostras eram submetidas ao teste sorológico com soro polivalente anti-O e as positivas a este teste encaminhadas à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - RJ em ágar nutriente para tipagem sorológica.

2.5 SAR

O teste de SAR foi realizado segundo Brasil⁶, utilizando-se antígeno colorido disponível no comércio. Para isso, 50 µL de soro e 50 µL de antígeno foram homogeneizados com bastão em placas de vidro de leitura para SAR e após dois minutos, verificou-se a formação ou não de aglutinação. Para cada teste realizado, utilizaram-se soros para controle positivo, produzido em aves SPF, e negativo, obtido de aves (*Gallus gallus domesticus*) comprovadamente livres de salmonelas.

2.6 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, com cálculo das percentagens de frequência relativa da detecção de *Salmonella* sp. e identificação dos sorovares.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após análise e interpretação das variáveis obtidas pelos questionários aplicados em cada propriedade visitada, procedeu-se a caracterização das propriedades informais de anseriformes na região estudada (Tabela 1).

Tabela 1: Variáveis utilizadas na caracterização do perfil produtivo e sanitário de 38 propriedades informais de criação de patos no Estado de Goiás e no Distrito Federal.

CARACTERÍSTICAS		N	%
Finalidade de produção	Subsistência	32	84,2
	Comercial	4	10,5
	Ornamental	2	5,3
Espécies de aves criadas	Galinhas	38	100
	Patos	38	100
Número aproximado de patos	Até 20	21	55,3
	De 21 a 40	14	36,9
	De 41 a 80	1	2,6
	Acima de 80	2	5,2
Número de aves mortas (Seis meses que antecederam à pesquisa)	De 0 a 5	29	76,3
	De 6 a 10	8	21
	De 11 a 20	0	0
	Acima de 21	1	2,7
Tipo de alimentação	Caseira	25	65,8
	Comercial	12	31,5
	Milho	34	89,5
	Capim	28	73,7
Origem da água	Lagoa	4	10,5
	Água corrente	32	84,2
	Água tratada	2	5,3
Aquisição dos patinhos	Compra	0	0
	Da propriedade	38	100
Tipo de incubação	Natural	36	94,7
	Incubadora	2	5,3
Destino das aves mortas	Fossa séptica	4	10,5
	Enterra	19	50
	Descarte	15	39,5
Controle de endoparasitas	Faz	9	23,7
	Não faz	29	76,3
Controle de ectoparasitas	Faz	8	21,05
	Não faz	30	78,9
Tipo de abrigo	Galpão	7	18,4
	Rústico	11	28,9
	Soltos	20	52,7

De acordo com as informações contidas na Tabela 1, na maior parte das propriedades avaliadas 32/38 (84,2%) a criação tinha finalidade de subsistência e em 04/38 (10,5%) a finalidade era comercial e em 02/38 (5,3%) a criação era ornamental. Na maioria das criações, a produção era destinada ao consumo próprio e o excedente era vendido, principalmente aos vizinhos, mas também para feiras e pequenos comércios locais. Apenas duas propriedades foram consideradas de grande porte, com mais de 80 patos.

O pato (*Cairina moschata*) foi a espécie de anseriforme mais criada nas regiões pesquisadas e constatou-se que em 38/38 (100%) delas havia criação consorciada com galinhas. A criação consorciada de aves de diferentes espécies pode potencializar a transmissão de patógenos, pois de acordo com da Silva et al.¹⁰, quando patos são criados com outras diferentes espécies de aves, existe a possibilidade de contaminação com agentes infecciosos, dentre eles bactérias, principalmente do gênero *Salmonella*.

Segundo estudos da Embrapa Meio-Norte¹¹, os problemas sanitários em criações informais podem representar um obstáculo ao sucesso da atividade, além de consistirem em uma fonte potencial para disseminação de doenças, em função da convivência das aves com outros animais domésticos, animais de produção e o homem.

Em relação à quantidade de patos, fez-se necessário utilizar estratificação de acordo com a quantidade de patos encontrados em cada propriedade visitada. Foi utilizada a seguinte distribuição: com até 20 aves 21/38 (53,3%), de 21 a 40 patos 14/38 (36,9%), de 41 a 80 patos 01/38 (2,6%) e acima de 81 aves 2/38 (5,2%).

Constatou-se que nas propriedades visitadas somente parte dos proprietários tinha preocupação com o destino das aves mortas nos últimos seis meses que antecederam o estudo, sendo que em 19/38 (50,0%) delas as carcaças eram enterradas nas áreas de pastagens próximas à criação e em 15/38 (39,5%) as aves mortas eram descartadas em locais afastados. O manejo inadequado dos animais mortos representa risco de transmissão de vários patógenos. Destaca-se o *Clostridium botulinum*, como apontado por Lobato et al.¹² e Juliano e Cardoso¹³, presente em carcaças de animais depositadas em locais impróprios, ou próximos a mananciais de água, podem liberar toxinas e se tornarem fontes de contaminação.

Nas propriedades avaliadas, não havia uma preocupação com alimentação específica para os patos, sendo utilizada em 12/38 (31,6%) rações para galinhas e em 25/38 (65,8%) alimentos caseiros. O milho também era uma fonte de alimento bastante

usada para manutenção dos anseriformes em 34/38 (89,5%), bem como o capim em 28/38 (73,7%), mesmo porque as aves viviam soltas, com acesso direto às gramíneas utilizadas pelos bovinos e equinos. O fornecimento de ração não adequada especificamente na primeira fase de vida das aves de postura, como relatado por Shim et al.¹⁴, pode afetar na qualidade e quantidade dos ovos, assim como nos índices zootécnicos destas aves.

Nas propriedades amostradas, a origem da água utilizada na criação dos patos em sua maioria era de fontes naturais 32/38 (84,2%), sem nenhum tratamento. Dessa forma, a falta de controle da água de abastecimento nas propriedades estudadas, assim como o livre acesso dos anseriformes a estes reservatórios poderiam representar riscos na transmissão de patógenos de veiculação hídrica, como destacado por Vieira¹⁵ e Dean e Sandhu².

Em relação ao acesso à água nas propriedades avaliadas, observou-se que os patos viviam em estreita relação com os seres humanos e com outros animais, com livre acesso aos mananciais, inclusive àqueles que serviam de abastecimento para as residências. De acordo com Dean e Sandhu² esse tipo de manejo favorece o aparecimento de patógenos, considerando que os anseriformes são possíveis fontes poluidoras destes reservatórios, que são utilizados pelo homem e pelos animais de produção.

A água potável em abundância deve estar disponível para patos pelo menos de 8 a 12 horas por dia, sendo que em sistemas de criação tecnificada adota-se manejo diferenciado, onde o alimento e a água são retirados durante o período noturno para ajudar a manter secos o interior dos galpões^{2,16}.

Para garantir a qualidade dos produtos de origem animal, alguns fatores são imprescindíveis, dentre eles, a sanidade e a biossegurança durante a criação. No caso dos patos, o ambiente que estas aves habitam também é fator determinante, inclusive para qualidade dos ovos, uma vez que muitas lagoas ou lagos no Brasil possuem águas contaminadas, facilitando veiculação de patógenos. Além disso, já foi comprovada que a ingestão de ovos de patas que têm acesso a águas contaminadas por mercúrio, bifenilpoliclorado¹⁷ e clordecona¹⁶ pode intoxicar quem os consome. Tais constatações vão de encontro com a crença popular de que patos são mais rústicos e resistentes às doenças do que frangos, revelando o descuido de muitos criadores com a sanidade e o manejo dos patos.

A reposição do plantel em 100% das propriedades visitadas era feita exclusivamente com patinhos do próprio plantel, sem aquisições externas, o que por um lado pode representar uma forma de proteção destas propriedades, minimizando a possibilidade de contaminação com patógenos de aves de diferentes origens.

Um dado importante foi o tipo de incubação dos ovos das patas nas propriedades visitadas, pois em 36/38 (94,7%) os ovos eram incubados de duas maneiras, pela própria pata ou por galinhas, o que aponta a possibilidade de veiculação de patógenos entre as duas espécies. Observou-se também que a postura era feita no mesmo ninho utilizado pelas galinhas, o que reforça a possibilidade de trocas precoces das populações microbianas, ou seja, desde a postura e incubação prolongando-se até os primeiros dias de vida dos patinhos.

O controle precário de endo e ectoparasitas foi outra condição inadequada no manejo dos patos das propriedades avaliadas, onde 29/38 (76,3%) dos proprietários não faziam controle de modo eficiente, talvez por acreditarem que os patos eram aves mais rústicas do que as galinhas¹⁸, não necessitando, portanto, de cuidados especiais.

O manejo ineficiente dos endoparasitas nos patos de criações informais pode levar a grandes infestações, como apontado por Mattos Junior et al.¹⁹, que em pesquisas com amostras fecais de 30 patos de seis criações extensivas no Estado do Rio de Janeiro no ano de 2002, detectaram positividade de 56,7%, por uma ou mais espécies de helmintos, determinando assim que a falta de controle, assim como o controle ineficiente destes agentes, pode determinar infestações com diferentes intensidades.

Em relação a proteção das aves às condições climáticas, os abrigos rústicos foram os mais utilizados em 11/38 (28,9%), e em 20/38 (52,7%) das propriedades os patos eram criados soltos, pois muitos criadores achavam desnecessários os abrigos.

Espécies silvestres e animais criados extensivamente nos fundos de quintais, como os patos, que normalmente são criados próximos aos seres humanos, podem apresentar risco de serem veiculadores de bactérias como *Salmonella* sp. No sentido de ampliar a caracterização do perfil produtivo e sanitário destas propriedades que possuíam criações destas aves em sistemas informais, utilizou-se o monitoramento sorológico pelo teste SAR e bacteriológico.

Na avaliação sorológica pela técnica SAR das 324 amostras de sangue colhidas de patos nas propriedades estudadas, 117/324 (36,1%) foram sororreagentes (Tabela 2).

TABELA 2: Resultados do teste de soroaglutinação rápida em placa SAR, para detecção de anticorpos anti-*Salmonella* em populações de anseriformes em 38 propriedades rurais estudadas.

Propriedade	Número de amostras	Amostras sororreagentes	% de aves sororreagentes
01	05	01	20,0
02	03	01	33,3
03	03	00	0,0
04	03	00	0,0
05	03	00	0,0
06	03	00	0,0
07	03	00	0,0
08	12	04	33,3
09	11	01	27,2
10	03	00	0,0
11	07	01	14,2
12	06	05	83,3
13	03	00	0,0
14	08	03	87,5
15	04	03	75,0
16	06	05	83,3
17	10	06	60,0
18	08	07	87,5
19	04	01	25,0
20	06	04	66,6
21	12	06	50,0
22	06	04	66,6
23	12	08	66,6
24	12	06	50,0
25	11	02	18,1
26	13	07	53,8
27	14	02	14,2
28	05	02	40,0
29	06	00	0,0
30	12	06	50,0
31	12	08	66,6
32	12	07	58,3
33	26	03	11,5
34	12	02	16,6
35	12	00	0,0
36	12	00	0,0
37	12	03	25,0
38	12	01	8,3
Total	324	117	(Média de 36,11%)

Segundo Buchala et al.²⁰ e Rodrigues²¹, a SAR é uma prova utilizada no monitoramento de plantéis avícolas, dotada de grande sensibilidade para a detecção dos anticorpos, porém, requer especificidade quanto à identificação do agente. Assim, deve-se usar provas mais específicas para suporte de um diagnóstico mais preciso. A realização de prova SAR com antígenos polivalentes O (somático), é utilizada com a

finalidade de detectar aves reagentes para *Salmonella Pullorum* e *Gallinarum*, e pode ser útil para reconhecer aves infectadas por diferentes sorovares.

Resultados semelhantes ao demonstrado na Tabela 2, com relação a soroprevalência de *Salmonella* pelo teste SAR, revelam que patos sororreagentes em criações informais têm sido identificados em outras regiões do Brasil, como destacado por Maia et al.²³, que testaram 489 amostras de soro sanguíneo, dos quais 26 amostras (5,32%) apresentaram reação sorológica positiva para *Salmonella Gallinarum* e *Salmonella Pullorum*.

Deve-se ressaltar que, no momento da colheita das amostras, as aves não apresentavam nenhuma manifestação clínica. Contudo, mesmo sem sintomatologia clínica, os patos podem estar infectados com *Salmonella* sp. representando, como destacado por Cha et al.²², risco de infecção para as aves de criações comerciais próximas e também para o homem.

Segundo Figueira et al.²⁴, o local de maior colonização por espécies patogênicas da família *Enterobacteriaceae* é a mucosa cecal, em comparação a outros locais do trato digestório. Assim, o material de predileção para verificar a colonização do trato intestinal do animal por enterobactérias são as fezes, menos para *Salmonella Gallinarum* que é difícil de ser isolada.

Pela prova bacteriológica, obteve-se duas amostras positivas nas 324 analisadas 02/324 (0,61%), tendo sido tipificados dois sorovares *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Hadar*.

Destaca-se que *Salmonella Hadar* tem sido frequentemente isolada em várias partes do mundo, inclusive em aves no Brasil. Em estudo conduzido por Ribeiro et al.²⁵, foram identificados 22 isolados de *Salmonella Hadar* em carcaças congeladas de frango no período de maio de 1995 a abril de 1996 no Estado do Rio Grande do Sul, utilizando-se o método microbiológico, o que representou 26% do total de isolados. Portanto, aves de produção e seus subprodutos podem ser veiculadores de *Salmonella* sp. aos produtos de origem animal destinados à alimentação humana.

Os resultados obtidos são semelhantes aos descritos por Adzitey et al.²⁶, em inquérito realizado na China, para determinação da prevalência dos sorovares de *Salmonella* sp. em excretas de patos, no qual obtiveram prevalência de (23,5%) em 125/531, com identificação de 29,6% de *Salmonella Typhimurium*, 12% de *Enteritidis*, 2,4% de *Gallinarum*, 12,0% de *Braenderup*, 11,2% de *Albany*, 20,8% de *Hadar*, 6,4% de *Derby*, 1,6% de *Weltevreden*, 3,4% de *Newbrunswick* e 0,8% *London*.

Considerando a ausência ou escassez de estudos em anseriformes e a citação na literatura da capacidade dos sorovares isolados serem capazes de infectar uma ampla variedade de hospedeiros, destaca-se que na galinha estes sorovares causam infecção do trato gastrointestinal, localizando-se principalmente no ceco e podendo persistir por vários meses. A infecção sistêmica, por outro lado, é geralmente passageira e com exceção de aves jovens quase não causam sinais clínicos. *Salmonella Gallinarum* e *Pullorum* infectam uma pequena variedade de espécies de aves, causando uma doença sistêmica grave²⁷.

De acordo com Berchieri Júnior et al.²⁸, o conhecimento sobre a epidemiologia de doenças transmissíveis tem importância fundamental para fins de delineamento de programas de saúde, permitindo a utilização de novas abordagens ao longo do processo de avaliação. Em qualquer fase de desenvolvimento de um programa, as fontes de infecção, representadas por animais de vida livre e de criações informais, como os anseriformes das propriedades de subsistência, são preocupações permanentes para as grandes criações, uma vez que estas aves representam potenciais reservatórios de doenças e têm sido objeto de atenção sob a ótica epidemiológica. Como são inexistentes estudos sobre salmonela em patos na região estudada, as informações obtidas com o presente estudo, podem auxiliar na elaboração de estratégias de controle desta bactéria nestas aves de criações informais no Estado de Goiás e Distrito Federal.

4. CONCLUSÕES

Na maioria das propriedades visitadas, o manejo produtivo e sanitário era deficiente ou inadequado. Os patos das propriedades pesquisadas apresentaram sorologia positiva ao teste SAR e foram poucos os isolados de *Salmonella* nos suabes cloacais.

REFERÊNCIAS

1. Bějcek V, Stastný K. Enciclopédia das Aves: as várias espécies e seus habitats. Lisboa: Livros & Livros; 2008. 55 p.
2. Dean WF, Sandhu TS. Health Management in home textiles ducks. University College of Veterinary Medicine Ithaca. New York; 2014. 70 p.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos Legais. Portaria nº 193 de 19 de setembro de 1994. Brasília; 1994. 14309-12 p.
4. De Oliveira GH, Berchieri Júnior Â, Montassier HJ, Fernandes AC. Assessment of serological response of chickens to *Salmonella* Gallinarum and *Salmonella* Pullorum by Elisa. Rev Bras Cienc Avic. 2004;6(2):111-5.
5. Barrow PA, Berchieri Jr A, Al-Haddad O. Serological response of chickens to infection with *Salmonella* gallinarum - *S.* pullorum detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Avian Dis. 1992:227-36.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003. Aprovam as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella* Gallinarum e de *Salmonella* Pullorum e Livres ou Controlados para *Salmonella* enteritidis e para *Salmonella* Typhimurium. Brasília; 2009. 499 p.
7. Rasschaert G, Houf K, De Zutter L. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. J Appl Microbiol. 2007;103(2):333-41.
8. McDonough PL, Jacobson RH, Timoney JF, Mutalib A, Kradel DC, Chang Y-f, Shin SJ, Lein DH, Trock S, Wheeler K. Interpretations of antibody responses to *Salmonella enterica* serotype enteritidis gm flagellin in poultry flocks are enhanced by a kinetics-based enzyme-linked immunosorbent assay. Clin Diagn Lab Immunol. 1998;5(4):550-5.
9. Waltman D. Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments: Oakwood: Georgia Poultry Laboratory; 1997. 293 p.
10. da Silva EE, de Souza Lopes E, de Castro Teixeira RS, de Albuquerque ÁH, da Rocha RC, Gomes Filho VJR, Vasconcelos RH, Maciel WC. Pesquisa de enterobactérias em patos domésticos (*Cairina moschata*) de propriedades localizadas em quatro municípios do Ceará, Brasil. Arq Inst Biol. 2014;81(1):16-21.
11. Meio-Norte E. Validação do sistema alternativo de criação de galinha caipira. Sistemas de Produção. Versão eletrônica. Teresina: Agricultura familiar; 2003.

12. Lobato FCF, Salvarani FM, Gonçalves LA, Pires PS, Silva ROS, Alves GG, Neves M, de Oliveira Júnior CA, Pereira PLL. Clostridioses dos animais de produção. *Veterinária e Zootecnia*. 2013;20:29-48.
13. Juliano JAF, Cardoso AM. *Clostridium botulinum* e suas toxinas: Uma reflexão sobre os aspectos relacionados ao Botulismo de origem alimentar. *Estudos*. 2014;41(3).
14. Shim MY, Song E, Billard L, Aggrey SE, Pesti GM, Sodsee P. Effects of balanced dietary protein levels on egg production and egg quality parameters of individual commercial layers. *Poult Sci*. 2013;92(10):2687-96.
15. Vieira JF. Animais domésticos: Origem, Manejo, Sanidade, Alimentação e Importância econômica: Clube de Autores; 2012.
16. Jondreville C, Lavigne A, Jurjanz S, Dalibard C, Liabeuf J-M, Clostre F, Lesueur-Jannoyer M. Contamination of free-range ducks by chlordecone in Martinique (French West Indies): a field study. *Sci Total Environ*. 2014;493:336-41.
17. Cheng J, Zhao W, Wang Q, Liu X, Wang W. Accumulation of mercury, selenium and PCBs in domestic duck brain, liver and egg from a contaminated area with an investigation of their redox responses. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2013;35(3):388-94.
18. Meulen CJ, Dikken G. Criação de patos nas regiões tropicais: Agrodok Wageningen: Fundação Agromisa; 2003. 96 p.
19. Mattos Junior DGd, Costa DdAd, Menezes RC, Mesquita EM. Prevalência de helmintos em patos domésticos *Cairina moschata* dom (Linné)(Anseriformes, Anatidae, Cairinini, Cairina) provenientes de criações extensivas no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev bras ciênc vet*. 2008;15(3):140-2.
20. Buchala FG, Ishizuka MM, Mathias LA, Berchieri Júnior A, Castro AGM, Cardoso A, Tessari ENC, Kanashiro AMI. Detecção de resposta sorológica contra *Mycoplasma* em aves de criatórios de “fundo de quintal” próximos a explorações comerciais do Estado de São Paulo. *Arq Inst Biol*. 2006;73(2):143-8.
21. Rodrigues DP. Perspectivas atuais e falhas no diagnóstico antigênico de *Salmonella* spp.: importância no reconhecimento dos sorovares circulantes, emergentes e exóticos. Simpósio Internacional sobre Salmonelose Aviária. Rio de Janeiro. 2011.
22. Cha SY, Kang M, Yoon RH, Park CK, Moon OK, Jang HK. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates in Pekin ducks from South Korea. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013;36(5):473-9.
23. Maia TAC, Ribas JRL, Moura LG, Batista MB, Garrido I, Santos JCM. Aves de quintal reagentes a *Salmonella* criada entorno de matrizeiros no pólo avícola de Feira de Santana, Bahia. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 38. 2011. Florianópolis-SC: Sociedade Brasileira de Medicina Veterinária. 2011:1-3.

24. Figueira SV, Mota BP, Leonídio RAA, Nascimento GM, Andrade MA. Microbiota intestinal das aves de produção. Enciclopédia Biosfera. 2014;10(18):2181.
25. Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Fittél AP, Nascimento VP. Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. Arq Inst Biol. 2006;73(3):357-60.
26. Adzitey F, Rusul G, Huda N. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* serovars in ducks, duck rearing and processing environments in Penang, Malaysia. Food Res Int. 2012;45(2):947-52.
27. Chappell L, Kaiser P, Barrow P, Jones MA, Johnston C, Wigley P. The immunobiology of avian systemic salmonellosis. Vet Immunol Immunopathol. 2009;128(1):53-9.
28. Berchieri Júnior A, Silva EN, di Fabio J, Sesti L, Zuanaze MAF. Doenças das aves. 2 ed. Campinas; 2009. 1104 p.

CAPÍTULO 3. PESQUISA DE *Salmonella* sp., TESTE DE SUSCETIBILIDADE E DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS EM OVOS DE PATAS (*Cairina moschata*)

RESUMO

O presente estudo foi realizado para pesquisar a presença de *Salmonella* sp. em ovos de patas oriundos de 38 criações informais e de 38 de feiras livres no Estado de Goiás e no Distrito Federal, com o objetivo de detectar *Salmonella* sp. em ovos de patas oriundos de feiras e propriedades. Foi procedido o isolamento de *Salmonella* nas estruturas componentes dos ovos (albúmen, casca e gema) e avaliada a suscetibilidade a 15 antimicrobianos de utilização na Medicina Veterinária e humana. Foram colhidos 912 ovos, cada quatro ovos corresponderam a uma amostra de *pool* de casca, uma de albúmen e uma de gema, totalizando 684 amostras. *Salmonella* sp. foi detectada em 36/684 (5,3%) das amostras de ovos. Os sorovares de *Salmonella* isolados nas estruturas dos ovos foram: 14/36 (38,3%) isolados no albúmen, divididos em 13 isolados em ovos de feiras e um isolado de ovos de propriedade de *Salmonella* Schwarzengrund. Na casca foram 8/36 (22,2%) dos isolados, sendo sete isolados de *Salmonella* Schwarzengrund de ovos de feiras e um isolado de *Salmonella* Typhimurium em ovos oriundos de propriedade rural. Na gema foram 14/36 (38,3%) dos isolados, sendo 12 de feiras compostos por um isolado *Salmonella* Heidelberg, um isolado *Salmonella* subespécie enterica O:9,12 e 10 isolados do sorovar *Salmonella* Schwarzengrund. Em propriedades foram dois isolados de amostras de gemas, sendo um sorovar *Salmonella* Schwarzengrund e um sorovar *Salmonella* Typhimurium. Os 36 isolados de *Salmonella* em ovos de patas foram submetidos ao teste de suscetibilidade a 15 antimicrobianos, Foram obtidas as seguintes distribuições percentuais de resistência: 29/36 (80,6%) a sulfonamida, 14/36 (38,9%) a enrofloxacina, 10/36 (27,8%) a amoxicilina, 7/36 (19,4%) a ampicilina, 7/36 (19,4%) a gentamicina, 6/36 (16,7%) ao trimetoprim, 6/36 (16,7%) a tetraciclina, 6/36 (16,7%) ao cotrimoxazol, 5/36 (13,9%) a neomicina, 5/36 (13,9%) a cefalotina, 5/36 (13,9%) ao ceftiofur, 3/36 (8,3%) ao florfenicol, 8,3% (3/36) ao cloranfenicol, 2/36 (5,6%) a ciprofloxacina e 0/36 (0%) a fosfomicina. Os 36 isolados de *Salmonella* foram ainda submetidos a prova de PCR em tempo real (rPCR), onde foram detectados os genes *rfbJ* em 94,3% dos isolados, o gene *Int1* em 20% e o gene *Sul1* foi em 17,1%. A presença de *Salmonella enterica* em ovos de patas comercializados nas feiras das regiões estudadas expõe a população ao risco em função de possíveis contaminações por este agente. A confirmação de multirresistência a diferentes classes de antimicrobianos utilizados em Medicina Veterinária e Humana, assim com a detecção de genes de resistência em isolados de *Salmonella* sp. em ovos na região pesquisada representa um problema e risco potencial à sanidade avícola e à saúde pública.

Palavras-chave: antibiograma, anatídeos, patógenos, feiras, rPCR.

CHAPTER 3. RESEARCH OF *Salmonella* sp., SUSCEPTIBILITY TEST, AND DETECTION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN DUCKS (*Cairina moschata*) EGGS PAWS

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the presence of *Salmonella* sp. in duck eggs coming from 38 informal farms and 38 markets in the state of Goiás and in the Federal District. We performed the isolation of *Salmonella* in the component structures of the eggs (albumen, shell, and yolk) and evaluated the susceptibility to 15 antimicrobials used in human and veterinary medicine. 912 eggs were collected and every four eggs corresponded to a sample pool of the shell, the albumen, and the yolk, totaling 684 samples. *Salmonella* sp. was detected in 36/684 (5.3%) of egg samples. The serotypes of *Salmonella* isolated from the egg structures were as follows: 14/36 (38.3%) isolates from the albumen (13 isolates from eggs coming from markets and one *Salmonella* Schwarzengrund isolate from a farm); 8/36 (22.2%) isolates from the shell (seven isolates of *Salmonella* Schwarzengrund from markets and one *Salmonella* Typhimurium isolate from a rural facility); 14/36 (38.3%) isolates from the yolk (12 of them coming from markets, composed of an isolate of *Salmonella* Heidelberg, an isolate of *Salmonella enterica* subspecies O: 9.12, and 10 isolates of *Salmonella* sorovar Schwarzengrund, and two isolates coming from farms, one *Salmonella* Schwarzengrund sorovar and one *Salmonella* Typhimurium sorovar). The 36 isolates of *Salmonella* from duck eggs were submitted to the susceptibility test to 15 antimicrobials and the following percentages of resistance were obtained: 29/36 (80.6%) to sulfonamides; 14/36 (38.9%) to enrofloxacin; 10/36 (27.8%) to amoxicillin; 7/36 (19.4%) to ampicillin; 7/36 (19.4%) to gentamicin; 6/36 (16.7%) to trimethoprim; 6/36 (16.7%) to tetracycline; 6/36 (16.7%) to cotrimoxazole; 5/36 (13.9%) to neomycin; 5/36 (13.9%) to cephalothin; 5 / 36 (13.9%) to ceftiofur; 3/36 (8.3%) to florfenicol; 8.3% (3/36) to chloramphenicol; 2/36 (5.6%) to ciprofloxacin; and 0/36 (0%) to fosfomicina. The isolates of *Salmonella* were also subjected to quantitative real-time PCR, and the following genes were detected: *rfbJ* in 94.3%, *Int1* in 20%, and *Sul1* in 17.1% of isolates. The presence of *Salmonella enterica* in eggs sold in markets of the studied regions studied exposes the population to the risk due to possible contamination by this agent. The confirmation of multidrug resistance to various classes of antimicrobials used in both veterinary and human medicine, as well as the detection of resistance genes in *Salmonella* isolates in eggs from the surveyed area represent a problem and a potential risk to poultry health and public health.

Keywords: antibiogram, anthrax, fairs, pathogens, rPCR.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura nacional, assim como a mundial, enfrenta dificuldades relacionadas à resistência antimicrobiana de patógenos em toda a cadeia de produção de aves. A resistência aos antimicrobianos vem sendo desenvolvida há muitas décadas, principalmente nos últimos 30 anos, com a emergência mundial de fenótipos multirresistentes entre os sorotipos de *Salmonella*, tais como *Salmonella* Typhimurium, Enteritidis Newport, dentre outras. Uma preocupação especial é o surgimento de resistência às quinolonas, fluoroquinolonas ou cefalosporinas e às drogas de amplo espectro como o ceftiofur e ceftriaxona^{1,2}. Portanto, a utilização abusiva de antimicrobianos promove uma pressão de seleção, favorecendo o surgimento de cepas resistentes e estreitando a escolha de medicamentos eficazes disponíveis para a terapêutica³.

Bactérias como *Salmonella*, que são transmitidas principalmente para o homem pela ingestão de água ou alimentos contaminados, apresentam acúmulo crescente de genes de resistência, havendo relatos de plasmídeos carregando genes de resistência a sete ou mais drogas, dificultando o tratamento⁴.

Um aspecto importante acerca da transmissão de *Salmonella* ao homem é a sua relação direta com consumo de alimentos de origem animal, principalmente de origem avícola⁵.

Existe ainda a possibilidade de fatores genéticos determinantes de resistência aos antimicrobianos se disseminarem entre salmonelas ou entre bactérias de espécies e gêneros diferentes. Os genes de resistência aos antimicrobianos podem ser detectados em estruturas genéticas consideradas móveis como plasmídeos, transposons, integrons e cassetes gênicos, ou podem estar fisicamente ligados ao genoma circular microbiano^{6,7}.

A resistência bacteriana é um termo utilizado para se referir aos microorganismos que não são inibidos por quantidades usualmente empregadas de substâncias antimicrobianas, ocorrendo a partir de um processo multifatorial bastante complexo. As bactérias com o objetivo de perpetuar sua espécie têm como ferramenta principal a aquisição de resistência aos antimicrobianos, que são conferidos através dos genes de resistência^{6,7}.

O ovo é uma estrutura biológica que tem a finalidade de proteger a formação do embrião contra contaminantes e nutrir o embrião em formação, contando com barreiras físicas, para impedir a entrada de agentes e barreiras químicas para tentar inativar os que porventura tenham conseguido atravessar e alcançar o conteúdo. As barreiras físicas são representadas pela cutícula, casca e membranas da casca. Dentre as barreiras químicas, destacam-se as proteínas antimicrobianas, como a lisozima, ovotransferrina, ovomucóide e avidina⁸.

A contaminação de ovos pode ocorrer no ovário ou oviduto durante a formação do ovo em aves infectadas, ou após postura, por contato com fezes que contaminam a casca, o que pode ser corroborado com Akhter et al.⁹.

Durante o armazenamento, alterações podem ocorrer no ovo devido às trocas gasosas entre as estruturas internas e o ambiente, realizadas através dos poros da casca. Desta forma, a clara perde água e gás carbônico, o que resulta em aumento do seu pH, com alterações de 7,6 até 9,7, podendo variar de acordo com a temperatura. Em consequência destas alterações, ocorre ruptura da estrutura de gel da clara e a membrana vitelina perde sua resistência, o que leva a gema a um estado fluído e a uma posição descentralizada, o que pode favorecer a contaminação das outras estruturas. As trincas nas cascas dos ovos facilitam a migração dos micro-organismos para seu interior, embora as claras apresentem propriedades capazes de impedir a multiplicação e sobrevivência do micro-organismo agressor¹⁰.

A multirresistência aos antimicrobianos é descrita nos isolados de *Salmonella* presentes em ovos de patas, que são consumidos inclusive com finalidade terapêutica. Assim podem veicular patógenos multirresistentes ao homem, como apontado por Labunska et al.¹¹

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos podem ser intrínsecos e extrínsecos. A resistência intrínseca é a resistência natural da bactéria contra um determinado grupo antibiótico. Entre os mecanismos de resistência intrínseca estão a barreira de permeabilidade, modificação dos locais alvo dos antibióticos ou a indução de genes reprimidos na presença de antibiótico. Já os mecanismos de resistência extrínsecos são adquiridos pela bactéria, principalmente por mutações cromossômicas e transferência de plasmídeos¹².

As análises dos perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos em *Salmonella* constituem ferramenta de alta importância para análise e monitoramento epidemiológico

de isolados, tendo sido apontado na literatura a existência de sorotipos multirresistentes, que podem ter graves implicações em saúde pública^{2,13,14}.

A detecção da resistência aos antimicrobianos mais comuns em *Salmonella* isoladas de patos tem se revelado um problema crescente mundial¹⁵. A utilização de antimicrobianos sem controle tem contribuído para o aumento de resistência bacteriana, desenvolvendo, assim, papel selecionador de cepas resistentes por meio da pressão seletiva, resultado do seu emprego na clínica, indústria ou comércio¹⁶⁻¹⁸. Apesar de patos, gansos, cisnes e marrecos serem menos submetidos a antibioticoterapias do que galinhas, devido à crença popular que estas aves sejam mais rústicas, alguns estudos têm apontado cepas de *Salmonella* resistentes a diversos antimicrobianos^{19,20}.

Diante do exposto, objetivou-se com este estudo o isolamento e a identificação da *Salmonella* sp. em ovos oriundos de propriedades e em ovos comercializados nas feiras livres, a determinação do perfil de suscetibilidade aos principais antimicrobianos utilizados em veterinária e medicina humana, assim como detectar pela PCR em tempo real os genes envolvidos na transmissão de resistência bacteriana.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local

As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia e as moleculares no Laboratório de Diagnóstico Molecular do Departamento de Medicina Veterinária da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (EVZ/UFG).

2.2. Amostragem

Os ovos foram colhidos por amostragem probabilística aleatória sistemática, que implicou na seleção de unidades em intervalos iguais.

Foram colhidos 456 ovos de patas, oriundos de 38 propriedades de criações informais, e 456 ovos em 38 feiras livres, sendo 12 ovos por propriedade e 12 por feira do Estado de Goiás e do Distrito Federal. Após cada colheita, foram mantidos nas mesmas embalagens provenientes das feiras e das propriedades, que eram caixas de transporte de ovos de galinhas reutilizadas, tipo polpa. Os ovos foram encaminhados no mesmo dia ao Laboratório de Bacteriologia (EVZ/UFG).

2.3. Pesquisa de *Salmonella* pela análise bacteriológica

No laboratório, foi feita assepsia de uma das extremidades dos ovos, com álcool 70% e desprezadas as porções da casca sanitizadas, e em sua extremidade de menor diâmetro foi feita abertura na casca e, através deste local, iniciou-se a pesquisa, com a separação das estruturas dos ovos.

Cada dúzia deu origem a três conjuntos de amostras que formaram um *pool*, onde, após a separação das estruturas foram homogeneizadas as amostras. Assim, para uma amostra, foram necessários quatro ovos para formar a quantidade desejada, isto é, 25g de casca ou 25 mL de albúmen e gema. Após a abertura e retirada do albúmen e da gema, procedeu-se à maceração do conjunto de quatro cascas, de forma a totalizar 25g, os quais foram adicionados em 225 mL água peptonada a 1%, que deram origem a 228 amostras de cascas. Os albúmens foram colhidos pela abertura da casca, com o auxílio de seringas descartáveis de 5 mL, colhidos ainda no interior de cada ovo e acondicionados em sacos plásticos contendo 225 mL água peptonada a 1% com 25 mL de albúmem, que deram origem a 228 amostras de albúmem. As gemas foram separadas dos albúmens logo após a colheita, e foram homogeneizadas. Coletou-se a quantidade

de 25 mL de gema, que foram colocadas em 225 mL água peptonada a 1%, dando origem a 228 amostras de gema.

Cada 4 ovos deram origem a 3 amostras, uma de casca, uma de albúmem e outra de gema.

Após um período de 24h de incubação a 37°C, as amostras foram homogeneizadas e 1 mL foi transferido para 9 mL de caldo Selenito Cistina (CS) e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV), seguindo-se incubação a 37°C/24h. Após este período, alíquotas de 2 mL de CS foram colocados em tubos e estocados a -20° para realização do PCR. Com auxílio de uma alça de níquel-cromo, alíquotas foram plaqueadas por esgotamento em superfície para os ágar: XLT4, Hektoen e Verde Brilhante e, novamente, incubados a 37°C/24h. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) com características morfológicas de *Salmonella* sp. foram selecionadas e três a cinco UFC por placa, foram transferidas para tubos contendo tríplice açúcar ferro (TSI) e incubados a 37°C/24h. As culturas em TSI com características de *Salmonella* foram submetidas aos testes de urease, produção de indol, vermelho metila, motilidade, lisina descarboxilase, teste do malonato e citrato de Simmons^{21,22} e quando as provas bioquímicas foram compatíveis com *Salmonella* foi feito teste sorológico com soro polivalente anti - O e as positivas, foram encaminhadas ao laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) em ágar nutriente para tipificação sorológica.

2.4. Testes de suscetibilidade aos antimicrobianos

A metodologia para determinação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, bem como a escolha dos fármacos e os parâmetros para controle de qualidade dos testes seguiram as recomendações do Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), National Committee for Clinical Laboratory Standards e Nccls²³.

Os isolados de *Salmonella* foram submetidos ao teste de suscetibilidade frente aos seguintes antimicrobianos: neomicina (30 mcg), florfenicol (30 mcg), fosfomicina (200 mcg), ceftiofur (30 mcg), cotrimoxazol (30 mcg), cefalotina (30 mcg), ampicilina (10 mcg), trimetoprim (5 mcg), tetraciclina (30 mcg), cloranfenicol (30 mcg), ciprofloxacina (5mcg), enrofloxacina (5mcg), sulfonamidas (300 mcg), amoxicilina (10 mcg) e gentamicina (10 mcg).

Amostras estocadas em nutriente foram colocadas em placas, realizando o TSI, em seguida, com uma agulha de níquel-cromo, transferiram-se cinco UFC, com

características morfológicas semelhantes para 5 mL de caldo Casoy. Incubou-se o caldo inoculado até atingir a turvação de 0.5 na escala MacFarland. Então, um suabe foi umedecido no caldo, pressionando contra as paredes do tubo para remover o excesso e esfregado em várias direções sobre a superfície da placa de Petri, contendo o ágar Mueller-Hinton, até obter uma camada uniforme e homogênea do inóculo. Aguardava-se em torno de 15 minutos para ocorrer a absorção do inóculo pelo ágar e então depositavam-se os discos de antimicrobianos sobre a superfície inoculada com o auxílio de uma pinça esterilizada. Os discos eram pressionados para uma melhor aderência ao meio e mantidos a uma distância de aproximadamente três cm um do outro. Uma vez colocados os discos, as placas foram incubadas em posição invertida à temperatura de 37°C/24h. Após este período, procedia-se a leitura dos halos de inibição, com auxílio de uma régua e os resultados foram interpretados de acordo com a tabela do fabricante, considerando a concentração do disco.

2.5. Detecção dos genes *Int11*, *Sul1* e *rfbJ* pela técnica da PCR em tempo real

Antes do processo de extração do DNA, as amostras congeladas em SC foram submetidas a um novo enriquecimento bacteriano. Foram utilizados Kit de extração Qiagen®.

Os ensaios de PCR em tempo real para detecção dos genes, *int11* e *sul1*, de *Salmonella* sp. foram realizados de acordo com Bugarel et al.²⁴. Já a detecção do gene *rfbJ* foi realizada de acordo com Muñoz et al.²⁵. Os eluatos obtidos a partir das amostras extraídas foram utilizados para realização de PCR em tempo real empregando o sistema TaqMan®. O volume adotado foi de 20µL utilizando 4,6µL de água mili-Q, 10µL de Máster Mix (1x), 2µL de mix de IPC (10x), 0,4µL de IPC DNA (50x) e 1µL de oligonucleotídeos iniciadores (concentração 30mM) e sonda (concentração de 10mM) acrescentando 2µL de amostras de DNA. Como controle interno da reação em dois foi feito em duplicatas dos poços da placa de 96 poços foi utilizado o IPC DNA com reagente bloqueador de IPC (*negative control blocked IPC*, Life®) e outro com IPC DNA sem bloqueador. As amostras foram submetidas ao ensaio de presença e ausência em termociclador StepOne Plus (*Applied Biosystems*) nas condições: pré PCR a 60°C por 30 segundos seguidas de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos (fase de desnaturação) e 60°C por 1 minuto e 60°C por 30 segundos para extensão.

Para detecção dos genes pela PCR em tempo real empregou-se o sistema TaqMan®, utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores para os genes (QUADRO 1).

QUADRO 1: Relação dos *primers* para detecção de genes de 35 isolados em ovos de patas.

Gene	Sequência dos <i>primers</i>	Número acesso GenBank	Localização	Referência
<i>Int1</i>	Fw 5'-TGGGCAGCAGCGAAGTC-3'	AF261825	27686 - 27670	Bugarel et al. (2011)
	Rv 5'-TGCGTGGAGACCGAAACC-3'		27617 - 27634	
	Sonda FAM-AGGCATTTCTGTCCTGGCTGGCG-BHQ		27668 - 27646	
<i>Sul1</i>	Fw5'-TCCTGACCCTGCGCTCTATC-3'	AF261825	29611 - 29630	Bugarel et al. (2011)
	Rv 5'-TGCGCTGAGTGCATAACCA-3'		29679 - 29661	
	Sonda ROX-ATTGCTGAGGCGGACTGCAGGC-BHQ		29636 - 29657	
<i>rfbJ</i>	Fw: 5'-GCATTTACCACATCATCTAC-3'	AE008792	305-424	Munoz et al. (2010)
	Rv: 5'-GCGATTAGAGCATGTATATG-3'			
	Sonda: FAM-TCTCTTATCTGTTTCGCTGTTGT-BHQ			

Foi feito um ajuste no equipamento para se adequar aos filtros disponíveis, no qual ROX foi substituído por TAMRA.

Os resultados foram analisados pelo programa *StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems)*, adotando-se o grau de confiança em 95%.

2.6. Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística descritiva, com cálculo dos percentuais de frequência relativa da detecção de *Salmonella* sp. e identificação dos sorovares.

Os resultados foram analisados pelo qui-quadrado programa *StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems)*, adotando-se o grau de confiança em 95%.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram analisados 912 ovos, dos quais 456 ovos foram provenientes de propriedades informais e 456 ovos foram colhidos em feiras livres. Isolou-se *Salmonella* em 1,2 % de propriedades informais e 9,4% de feiras, sendo que a média do total de amostras analisadas foi 5,3% (Tabela 1).

TABELA 01: *Salmonella* em amostras colhidas em propriedades e feiras

	Propriedades positivas	%	Amostras positivas	%
Propriedades	4/38	10,5a	4/342a	1,2
Feiras	32/38	84,2b	32/342b	9,4
TOTAL	36/76	47,4	36/684	5,3

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística (P-valor <0,00001) em nível de 5 % de significância pelo Qui-quadrado.

Em relação ao universo amostral 36/684 (5,3%), foram observados baixos percentuais de isolados no presente trabalho, contudo, nota-se que 80% dos surtos de salmonelose são devidos ao consumo de ovos crus ou malcozidos²⁶, o que contribui, segundo os autores, para o grande impacto observado em saúde pública.

Diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada entre a frequência de *Salmonella* obtida nos ovos adquiridos nas feiras (84,2 %), em relação aos colhidos nas propriedades (10,5%). Este resultado revela um fator de risco à saúde pública, pois os ovos comercializados nas feiras, geralmente por unidade, são consumidos em especial por crianças, pessoas idosas e convalescentes. De acordo com Mughini-Gras et al.²⁷, ovos com *Salmonella* são uma das fontes de infecções alimentares para o homem.

A maior frequência de *Salmonella* nas amostras obtidas em ovos de feiras pode ser atribuída a diferentes fatores, como o tempo de armazenamento, limpeza inadequada da casca e mesmo a contaminação cruzada durante o processo de coleta na propriedade, no armazenamento e na manipulação ou na comercialização do produto. Estes resultados podem ser respaldados pelas afirmações de Martelli e Davies²⁸, que relataram que no sistema produtivo de ovos, os fatores de risco mais importantes que contribuem para a contaminação e disseminação de bactérias do gênero *Salmonella*, após a postura, incluem: condições inadequadas de armazenamento, seja nas granjas, pontos de distribuição, venda ou no ambiente domiciliar.

Adicionalmente, como observado no presente estudo, nos sistemas de produção informal os ovos de patas são geralmente armazenados e mantidos em caixas (tipo polpa), reutilizadas dos ovos de galinha, o que pode possibilitar a ocorrência de contaminação cruzada. A partir da análise visual dos ovos das duas origens, suspeitou-se que os ovos oriundos das feiras passaram por algum tipo de higienização na casca. Este procedimento foi confirmado por alguns feirantes e tinha a finalidade de melhorar o aspecto visual e assim proporcionar uma melhor aceitação pelos compradores. Contudo, o processo de higienização dos ovos, sem critérios técnicos, podem carrear patógenos da parte externa do ovo para o seu interior²⁷.

Ressalta-se que ovos aptos para consumo deverão ser desprovidos de sujidades, rupturas ou trincas e devem ser devidamente acondicionados²⁹. Observou-se que os ovos de patas comercializados e originários das regiões pesquisadas não foram submetidos à inspeção, representando riscos à saúde pública.

A higienização inadequada dos ovos de patas que eram vendidos nas feiras livres, assim como o armazenamento prolongado e sem controle ideal de temperatura, podem contribuir para a migração de micro-organismos, dentre eles *Salmonella*, da casca para as demais estruturas destes ovos^{28,30}.

Na Tabela 2 e 3 estão registradas as frequências dos isolados de *Salmonella* com os respectivos sorovares, por estrutura dos ovos e de acordo com a origem.

TABELA 2: Sorovares identificados em ovos de patas de acordo com a origem das coletas

Sorovares	Feiras N (%)	Propriedades N (%)	Feiras + Propriedade N (%)
Schwarzengrund	30 (94%)	2(50%)	32 (88,9%)
Typhimurium	0	2(50%)	2 (5,5%)
Heidelberg	1 (3%)	0 (0%)	1 (2,8%)
Fórmula antigênica: O.9,12	1 (3%)	0 (0%)	1 (2,8%)
Total	32	4	36

Dentre os sorovares detectados, foi identificado *Salmonella* Schwarzengrund em 88,9%, sendo que o maior número de isolamento (94%) ocorreu em feiras. *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* O.9,12 foram detectadas em 5,5%; 2,8% e 2,8% respectivamente em propriedades.

TABELA 3: Distribuição dos sorovares de *Salmonella* por estrutura dos ovos

Sorovares	Estrutura	N. de isolados %	Feiras %	Propriedades %
Schwarzengrund	Albúmen	14 (38,9%)	13/32 (40,6%)	01/36 (2,8%)
Schwarzengrund Typhimurium	Casca	08 (22,2%)	07/32 (21,9%)	01/36 (2,8%)
Schwarzengrund Typhimurium O:9,12 Heidelberg	Gema	14 (38,9%)	12/32 (37,5%)	02/36 (5,6%)
	Total	36	32/36 (88,8%)	4/36 (11,2%)

Observa-se que o maior número de *Salmonella* foi isolado em albúmen e gema (38,9%) quando comparado com casca (22,2%). *Salmonella* Schwarzengrund foi o único sorovar que esteve presente nos três tipos de estruturas, seguido por *Salmonella* Typhimurium que esteve presente em casca e gema. Por último, foram detectadas *Salmonella* O:9,12 e *Salmonella* Heidelberg em gemas.

Tais resultados condizem com o trabalho de Moraes et al.³¹, destacando-se o sorovar frequente nas amostras dos ovos de galinhas poedeiras foi *Salmonella* Schwarzengrund. Também, de acordo com Chen et al.³², em vários lugares do mundo *Salmonella* Schwarzengrund tem sido detectada em diferentes tipos de amostras, geralmente relacionada com infecção em aves e em seres humanos e vem apresentando elevada resistência a vários antimicrobianos utilizados nas linhas humana e animal.

Salmonella Typhimurium, que foi identificada em casca e gema de ovos de patas (Tabela 3), tem sido relacionada à infecção alimentar e, além disso, registrada como uma das mais prevalentes nas Américas e em países que compõem a União Europeia. Também foi detectada com frequência no Pacífico Ocidental, no Sudeste Asiático e África^{33,34}.

Em estudo desenvolvido por Cha et al.¹⁷ para determinar a prevalência de sorovares de *Salmonella* sp. em 69 fazendas de patos, três sorovares de *Salmonella* enterica foram identificados em 85 isolados. *Salmonella* Typhimurium representou 45,9% (39/85) dos isolados, enquanto que *Salmonella* Enteritidis 51,8% (44/85) e *Salmonella* London 2,3% (2/85). Segundo os autores, a transmissão está associada com o consumo de carne de aves e produtos alimentícios preparados a partir de ovos. Ocasionalmente, os patos participam da transmissão deste patógeno alimentar. Devido a infecções inaparentes e condições sanitárias precárias, esta possibilidade de propagação aos seres humanos pode ser mais elevada do que em galinhas.

Kim et al.²⁰, ao estudarem a prevalência de *Salmonella* sp. e *Escherichia coli* em fazendas de criações na Coreia do Sul, coletaram 400 amostras oriundas de materiais de patos e detectaram *Salmonella* em 22,7% (83/400). Assim como citado acima, *Salmonella* Typhimurium foi o sorovar mais isolado (61,4%). Isto reforça a importância desde sorovar em criações de patos para consumo humano, devido ao potencial zoonótico desta bactéria.

Salmonella Heidelberg foi isolada e identificada em uma estrutura de ovo, um isolado da gema (Tabela 3). Segundo apontado por Chittick et al.³⁵ e Foley e Lynne³⁶, *Salmonella* Heidelberg tem sido identificada com destaque na América do Norte em carnes e ovos de aves. No Brasil, *Salmonella* Heidelberg é um dos cinco principais sorovares associados a infecções em seres humanos e um dos mais comumente isolados em galinhas, perus e suínos³⁶.

Os resultados do perfil de suscetibilidade dos isolados de *Samonella* isoladas de ovos de patas podem ser observados na Tabela 4.

TABELA 4: Suscetibilidade a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* obtidos de ovos de patas oriundos de propriedades e feiras

Antibióticos	Sensível		Intermediária		Resistente	
	N	%	N	%	N	%
Fosfomicina	35	97,2	1	2,8	0	0
Florfenicol	33	91,7	0	-	3	8,3
Cloranfenicol	32	80,5	1	2,8	3	8,3
Ciprofloxacina	32	80,5	2	5,5	2	5,6
Cotrimoxazol	30	83,3	0	-	6	16,7
Cefalotina	30	83,3	1	2,8	5	13,9
Trimetoprim	30	83,3	0	-	6	16,7
Tetraciclina	29	82,8	1	2,8	6	16,7
Gentamicina	29	82,8	0	0	7	19,4
Ceftiofur	28	77,8	3	8,3	5	13,9
Ampicilina	28	77,8	1	2,8	7	19,4
Amoxicilina	26	72,2	0	0	10	27,8
Neomicina	22	61,1	9	25,0	5	13,9
Enrofloxacina	4	11,1	18	50,0	14	38,9
Sulfonamidas	3	8,3	4	11,1	29	80,6

De acordo com os dados mostrados na Tabela 4, os 36 isolados apresentaram maior sensibilidade à fosfomicina (97,2%), a florfenicol (91,7%), cloranfenicol (97,1%) e cotrimoxazol (83,3%). Por outro lado, apresentaram baixa sensibilidade a enrofloxacina e sulfonamidas (11,1% e 8,3%, respectivamente). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Flament et al.³⁷, na Bélgica, que

observaram altos índices de resistência a pelo menos dois antimicrobianos. Ainda, foi observada resistência de 21,6% para mais de cinco drogas, sendo que os isolados apresentaram baixa frequência de sensibilidade ao cloranfenicol e florfenicol (26,1% e 33% respectivamente) e sensibilidade de 97,7% a gentamicina, 94,3% a cefalotina e 54,5% ao ciprofloxacina, dados percentuais próximos aos encontrados neste estudo.

No presente estudo, foi detectada resistência de 29/36 (80,6%) as sulfonamidas, 14/36 (38,9%) a enrofloxacina e 10/36 (27,8%) a amoxicilina. Resultados semelhantes à presente pesquisa foram descritos por Lai et al.³⁸ em amostras colhidas de patos em províncias da China, nos anos de 2009 a 2012, onde foi observada resistência às sulfonamidas de 76,6%, tendo os autores destacado que as elevadas taxas de resistência provavelmente tenham sido devidas à utilização de agentes antimicrobianos incorporados à alimentação animal e à utilização em níveis terapêuticos ou sub-terapêutica para prevenir a bacteriose ou para promover o crescimento animal.

De acordo com Adzitey et al.³⁹, em estudo realizado na Malásia, verificaram resistência a 13 antimicrobianos diferentes em 531 amostras de patos oriundos de fazendas de criação e processamento. Os autores salientaram, ainda, que todos os sorovares foram resistentes à eritromicina, mas susceptíveis à cefalotina, gentamicina e ceftiofur. A sensibilidade destacada pelos autores aos antimicrobianos acima citados foram semelhantes aos encontrados no presente estudo. Ainda, os mesmos autores observaram, nos últimos 25 anos, resistência acima de 50% para apenas três princípios de antimicrobianos, dentre eles eritromicina e tetraciclina (em 100% e 70,6% dos estudos). Resistência a cloranfenicol (13,2%), florfenicol (1%) e ciprofloxacina (0%) foram observadas em poucos estudos. Os dados anteriormente apresentados foram semelhantes ao presente estudo em relação a incidência dos mesmos antimicrobianos, contudo, os valores percentuais foram diferentes, 8,3% ao cloranfenicol, 8,3% ao florfenicol e 5,6% a ciprofloxacina, de acordo com a Tabela 4.

Na Tabela 4, são demonstrados, também, a ocorrência de alta sensibilidade dos isolados a nove antimicrobianos com valores percentuais acima de 80% e 12 acima de 70% respectivamente, resultados semelhantes ao descrito no estudo de de Lima et al.¹³, que relataram que, frente à maioria dos antimicrobianos testados, apresentou sensibilidade elevada a Trimetoprim (88,6%), Cloranfenicol (87,2%), Gentamicina (82,2%), Ciprofloxacina (80,4%), Neomicina (73,6%) e Tetraciclina (68,6%), destacando que pode estar ocorrendo uma maior conscientização na produção avícola. Porém, a existência de amostras de *Salmonella* resistentes indica que ainda há

necessidade de um maior controle no uso de antimicrobianos, minimizando a introdução e a rápida disseminação desse micro-organismo nas aves e conseqüentemente nos seres humanos. Outro fator relevante está relacionado com a resistência dos isolados ao cloranfenicol pois, apesar da sua proibição na alimentação animal há mais de 13 anos, foram detectados isolados com resistência a este fármaco, o que poderia ser explicado pela utilização em grande escala anteriormente em avicultura ou talvez por sua utilização de maneira ilícita nos dias atuais^{19,22}.

Os criadores provavelmente consideram que os anseriformes sejam mais resistentes às doenças do que as galinhas sendo, conseqüentemente, raramente medicados^{40,41}. Acredita-se que esta frequência de resistência encontrada nos ovos de patas seja decorrente da estreita convivência com outras aves, em especial com as galinhas, já que os patos eram criados em consórcio nas regiões estudadas.

Na Tabela 05 está demonstrado o padrão de resistência aos antimicrobianos testados em 36 isolados de *Salmonella* em estruturas de ovos de patas.

TABELA 5: Distribuição dos padrões de resistência a 15 antimicrobianos testados em isolados de *Salmonella* em estruturas de ovos de patas.

Classificação da resistência	Número padrões de resistência	%
Múltipla	07-36	19,4
Tripla	03-36	8,3
Dupla	09-36	25,0
Simples	13-36	36,11

Perfil de resistência	Padrões de resistência	Número de cepas
Múltipla	FLF, SUT, CFL, AMP, TRI, TET, CLO, CIP, ENO, SUL, AMO GEN	1
Múltipla	FLF, SUT, AMP, TRI, TET, CLO, CIP, ENO, SUL, AMO, GEN	1
Múltipla	NEO, CTF, SUT, CFL, AMP, TRI, TET, ENO, SUL, AMO, GEN	1
Múltipla	NEO, CTF, SUT, CFL, AMP, TRI, TET, SUL, AMO, GEN	3
Múltipla	FLF, AMP, CLO, SUL, AMO	1
Tripla	NEO, ENO, AMO	2
Tripla	ENO, SUL, GEN	1
Dupla	ENO, SUL	7
Dupla	SUL, GEN	1
Dupla	SUL, AMO	1
Simples	SUL	10
Simples	CTF	1
Simples	AMO	1

NEO: neomicina, FLF: florfenicol, FOS: fosfomicina, CTF: ceftiofur, SUT: cotrimoxazol, CFL: cefalotina, AMP: ampicilina, TRI: trimetoprim, TET: tetraciclina, CLO: cloranfenicol, CIP: ciprofloxacina, ENO: enrofloxacina, SUL: sulfonamidas, AMO: amoxicilina, GEN: gentamicina.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, detectou-se perfis distintos de resistência múltipla em 8/36 (22%) das cepas, sendo uma com 12 antimicrobianos, duas com onze, três com dez e uma com cinco antimicrobianos. Na resistência tripla obteve-se três cepas e na resistência simples foram detectadas doze cepas.

Os resultados aqui descritos evidenciaram a presença de *Salmonella* em ovos de patas das regiões contempladas neste trabalho, indicando a necessidade de se estabelecerem medidas adequadas de controle do patógeno, principalmente ao se considerar os perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos apresentados pelas cepas em estudo, com destaque para o fator da multirresistência aos antimicrobianos testados.

Em estudo desenvolvido por de Toro et al.⁴² na Espanha, durante o período de 2009 a 2010, foram detectados 114 isolados *Salmonella*, distribuídos em 18 sorovares distintos, com prevalência de *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis (61% e 16%, respectivamente). Uma elevada percentagem de resistência foi observada a sulfonamidas (68%), tetraciclina (58%), ampicilina (55%) e estreptomicina (46%) dos 114 isolados estudados. Também foram apontados por estes autores perfis de resistência a múltiplas drogas (resistência a três ou mais antibióticos), sendo as associações mais comuns que mostraram resistência foram ampicilina-estreptomicina-tetraciclina-sulfonamidas (19 isolados) e ampicilina-estreptomicina-tetraciclina-cloranfenicol-sulfonamidas (14 isolados). Kim et al.²⁰ detectaram 34,9% (29/83) de multirresistências aos agentes antimicrobianos testados, fato este de relevância em saúde pública. Ambos os resultados corroboram os encontrados no presente estudo.

De acordo com Pandini et al.⁴³, em estudo realizado de 2010 a 2011 no Estado do Paraná em suabes de arrasto, foram analisadas 342 amostras, das quais 39 foram positivas para *Salmonella*, onde em todas as amostras isoladas verificou-se que *Salmonella* Heidelberg apresentou a maior frequência, (12,82%) e que mais de 50% dos isolados apresentaram resistência a todos os 12 antimicrobianos testados, valores semelhantes aos detectados no presente estudo.

O perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp. em isolados de aves e seus produtos frente a agentes antimicrobianos tem sido alvo de inúmeras pesquisas. Nesse sentido, destacam-se estudos em que foram encontrados isolados de *Salmonella* sp. com elevadas taxas de resistência no Brasil⁴³⁻⁴⁵, assim como nos Estados Unidos⁴⁶, União Europeia⁴⁷ e Grécia⁴⁸.

Na Tabela 6 está descrita a distribuição dos genes de resistência presentes em isolados de *Salmonella* oriundos de ovos de patas.

TABELA 6: Distribuição dos genes de resistência em cepas isoladas *Salmonella* de ovos de patas

Gene	Positivos	
	Número	%
<i>RfbJ</i>	33/35	94,3
<i>Int1</i>	07/35	20,0
<i>Sul1</i>	06/35	17,1

A ocorrência do gene para *rfbJ* foi de 94,3% e do gene *Sul1* foi de 6/35 (17,1%).

O gene *rfbJ*, apesar de não ser um gene de resistência, foi o mais frequente neste estudo, com valor percentual de 94,3%. De acordo com Shanmugasundaram et al.⁴⁹, os genes *rfbJ* codificam a sintase glicosilo e enzimas de transferase de antígeno O polissacárido, que são enzimas envolvidas na síntese de abequose (um açúcar presente no antígeno O) e confere especificidade antigênica em *Salmonella*. Ainda segundo os mesmos autores, o gene *rfbJ* é utilizado para detecção de *Salmonella* sp., confirmando assim o alto percentual detectado no presente estudo.

Em estudo desenvolvido por Shanmugasundaram et al.⁴⁹, utilizando o PCR monoplex para identificar *Salmonella* Typhimurium a partir de amostras de água e alimentos, em que os genes alvos eram *invA*, *ironB*, STM4497, STM2755, *fliC* e *rfbJ*, onde o gene *rfbJ* foi utilizado como método de detecção de *Salmonella*, conseguiram identificar dois dos sete isolados bioquimicamente de suspeitos de serem *Salmonella*. Segundo os mesmos autores, a técnica PCR tornou-se uma alternativa potencialmente poderosa em diagnósticos microbiológicos devido a sua simplicidade, rapidez, reprodutibilidade e precisão.

No presente estudo, foram detectados nos isolados de *Salmonella*, os genes *Int1* e *Sul1*, nos percentuais de (100%) para ambos genes, valores superiores aos encontrados por Bugarel et al.²⁴, que em pesquisa com 538 isolados de *Salmonella* Typhimurium a partir de amostras oriundas de animais de produção no período de 1999 a 2009, em produtos alimentícios, amostras humanas e amostras ambientais, com base na presença ou ausência de marcadores, distinguiram 34 genótipos diferentes, incluindo

os dois principais genótipos encontrados *IntI1* e *Sul1*, que foram encontrados em (52% e 54%) dos isolados, respectivamente.

O gene *IntI1*, foi o segundo gene mais prevalente (20%) nos isolados de *Salmonella* de ovos de patas. O resultado aqui descrito difere do encontrado por Hsu et al.⁵⁰, que ao analisarem 499 isolados de *Salmonella*, detectaram o gene *intI1* em 83,6% dos isolados.

De acordo com Mazel⁵¹, integron está relacionado com o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em *Escherichia coli* e *Vibrio cholera* e mais de 100 cassetes de genes diferentes transportam por integron de classe 1 foram encontrados e cinco classes de integrons já foram identificados. Contudo, verifica-se que a classe 1 integron desempenha um papel importante nesta disseminação de genes resistentes aos antimicrobianos e tem sido o principal contribuinte para a múltipla resistência em bactérias Gram-negativas⁷.

O gene *Sul1* foi detectado em 17,1% dos isolados de *Salmonella*. Destaca-se ainda que os seis isolados que foram positivos para o gene *Sul1*, apresentaram resistência quando testados para detecção do perfil de susceptibilidade ao antimicrobiano sulfonamida, apresentou 100% de resistência a este fármaco. Os resultados aqui obtidos foram inferiores aos encontrados por Antunes et al.⁵², que ao analisarem 200 isolados de *Salmonella* de diversas fontes, detectaram 152 (76%) *Sul1*.

Os integrons de classe 1 e 2, tem papel fundamental na disseminação da resistência antimicrobiana às sulfonamidas em bacilos Gram-negativos. Geralmente, a aquisição de resistência ocorre quando surge qualquer um dos dois genes *sul1* e *sul2*, formas de codificação de dihidropteroato sintetase que não são inibidos pelo fármaco⁵². O gene *sul1* é normalmente encontrado ligado a outro gene de resistência e faz parte do segmento conservado 3' (3'CS) de integrons de classe 1, enquanto o gene *Sul2* encontra-se ligado com os genes *str* (que conferem resistência à estreptomicina) geralmente localizado em pequenos plasmídeos não conjugados ou relacionado a transmissão de multirresistência. Destaca-se ainda que o gene *sul3*, ocorre em *Salmonella* portadora de integron classe 1 com cassetes de genes *Aada* e *dfrA*, que confere resistência ao sulfametoxazol e trimetoprim, combinação frequentemente utilizada em terapêutica. Os três genes conferem resistência às sulfonamidas⁵³.

Segundo Bugarel et al.²⁴, a resistência à sulfonamida é detectada por gene *sul1*, mais frequentemente associado com o SGI1 aglomerado de genes e estirpes tipo de fagotipo DT104. A incidência de *sul1* varia de acordo com fontes de isolamento,

sendo encontrado os mais altos níveis em suínos (75%) e bovinos (74%) isolados e a menor em aves poedeiras (41%).

Na tabela 7 pode-se observar a distribuição dos genes *Int11*, *Sul1* e *rfbJ*.

TABELA 7: Distribuição regional dos genes *Int11*, *Sul1* e *rfbJ* em sorovares de *Salmonella* isolados de ovos de patas oriundos de propriedades informais e feiras do Estado de Goiás e do Distrito Federal.

Sorovar	Gene <i>Int11</i>		<i>Sul1</i>		<i>rfbJ</i>	
	Número	%	Número	%	Número	%
Schwarzengrund	05/31	16,2	04/31	12,9	29/31	82,86
Typhimurium	02/02	100	02/02	100	02/02	100
Heidelberg	00/01	0	00/01	0	01/01	0
O:9;12	00/01	0	00/01	0	01/01	0
Total	7/35		06/35		33/35	

O gene *RfbJ* foi detectado em 29/31 (82,7%) no sorovar Schwarzengrund, 02/02 (100%) no sorovar Typhimurium, no sorovar Heidelberg e 01/01 (100%) na forma antigênica O:9;12. O gene *Int11* foi detectado em 05/31 (16,2%) no sorovar Schwarzengrund e 02/02 (100%) no sorovar Typhimurium. O gene *Sul1* foi detectado em 04/31 (12,9%) no sorovar Schwarzengrund e 02/02 (100%) no sorovar Typhimurium.

4. CONCLUSÕES

Foram detectados os seguintes sorovares: *Salmonella* Schwarzengrund, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* O.9,12. O isolamento de *Salmonella* na casca, no albúmen e na gema, em ovos das propriedades de criações informais e em ovos comercializados nas feiras livres, representa risco à saúde pública nas regiões pesquisadas.

A verificação de multirresistência a diferentes classes de antimicrobianos utilizados em Medicina Veterinária e Medicina Humana, assim com a detecção de genes de resistência em isolados de *Salmonella* sp. em ovos da região pesquisada apresenta-se como um problema e risco potencial à sanidade avícola e à saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food-and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev.* 2002;26(2):141-8.
2. Hur J, Jawale C, Lee JH. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Res Int.* 2012;45(2):819-30.
3. Dione MM, Ikumapayi U, Saha D, Mohammed NI, Adegbola RA, Geerts S, Ieven M, Antonio M. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal. *J Infect Dev Ctries.* 2011;5(11):765-75.
4. Anjum MF, Choudhary S, Morrison V, Snow LC, Mafura M, Slickers P, Ehrlich R, Woodward MJ. Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. *J Antimicrob Chemother.* 2011:498.
5. Leonídio ARA, Nascimento GM, Figueira SV, de Souza Almeida AM, Moraes DMC, Andrade MA. Genes de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. *Jornal Brasileiro de Ciência Animal.* 2015;8(15):574-614.
6. Michael GB, Butaye P, Cloeckert A, Schwarz S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. *Microbes Infect.* 2006;8(7):1898-914.
7. Krauland MG, Marsh JW, Paterson DL, Harrison LH. Integron-mediated multidrug resistance in a global collection of nontyphoidal *Salmonella enterica* isolates. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3):388-96.
8. Seockmo K, Eduardo X, Thomas K, Michael RL. *Salmonella* in Shell Eggs: Mechanisms, Prevention and Detection. *J Nutr Food Sci.* 2016;2016:1-7.
9. Akhter J, Hossain MT, Islam MT, Siddique MP, Islam MA. Isolation and identification of microflora from apparently healthy caged parrots of Dhaka zoo of Bangladesh. *Bangladesh j vet med.* 2010;8(1):05-10.
10. Figueiredo TC, Cançado SV, Viegas RP, Rêgo IO, Lara LJ, Souza MR, Baião NC. Qualidade de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Arq bras med vet zootec.* 2011;63(3):712-20.
11. Labunska I, Harrad S, Santillo D, Johnston P, Yun L. Domestic duck eggs: an important pathway of human exposure to PBDEs around e-waste and scrap metal processing areas in Eastern China. *Environ Sci Technol.* 2013;47(16):9258-66.
12. Paphitou NI. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42:25-8.

13. de Lima ET, Andreatti Filho RL, Pinto JPdAN. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* isolados de produtos avícolas. *Veterinária e Zootecnia*. 2009;16(2):394-400.
14. Mendes FR, Leite PRSC, Ferreira LL, Lacerda MJR, Andrade MA. Utilização de antimicrobianos na avicultura - artigo número 197. *Revista Eletrônica Nutritime*. 2013;10(2):2352-89.
15. Xu J, Yin Z, Li L, Cheng A, Jia R, Song X, Lu H, Dai S, Lv C, Liang X. Inhibitory effect of resveratrol against duck enteritis virus in vitro. *PloS one*. 2013;8(6):e65213.
16. Giguère S, Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, Dowling PM. *Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária*. São Paulo: Ed: Roca; 2010. 683 p.
17. Cha SY, Kang M, Yoon RH, Park CK, Moon OK, Jang HK. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates in Pekin ducks from South Korea. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2013;36(5):473-9.
18. Greeson K, Suliman GM, Sami A, Alowaimer A, Koohmaraie M. Frequency of antibiotic resistant *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus aureus* in meat in Saudi Arabia. *Afr J Microbiol Res*. 2013;7(4):309-16.
19. Galdino VMCA, de Melo RT, Oliveira RP, Mendonça EP, Nalevaiko PC, Rossi DA. Virulência de *Salmonella* spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. *Biosci J*. 2013;29(4):932-9.
20. Kim H, Lee J, Jang Y, Chang B, Kim A, Choe N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from ducks in Korea. *Korean J Vet Res*. 2016;56(2):91-5.
21. Georgia Poultry Laboratory. Monitoring and detection of *Salmonella* in poultry and poultry environments; 1997. 2000. 293 p.
22. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária .Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de 2003. Aprovam as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. Brasília; 2009. 499 p.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Nccls. Bacterial from animal; 2002. 81 p.
24. Bugarel M, Granier SA, Weill F-X, Fach P, Brisabois A. A multiplex real-time PCR assay targeting virulence and resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *BMC microbiol*. 2011;11(1):1.
25. Muñoz N, Diaz-Osorio M, Moreno J, Sánchez-Jiménez M, Cardona-Castro N. Development and evaluation of a multiplex real-time polymerase chain reaction

- procedure to clinically type prevalent *Salmonella enterica* serovars. *J Mol Diagn.* 2010;12(2):220-5.
26. Wellman-Labadie O, Picman J, Hincke MT. Antimicrobial activity of the Anseriform outer eggshell and cuticle. *Comp Biochem Physiol Biochem Mol Biol.* 2008;149(4):640-9.
27. Mughini-Gras L, Enserink R, Friesema I, Heck M, van Duynhoven Y, van Pelt W. Risk factors for human salmonellosis originating from pigs, cattle, broiler chickens and egg laying hens: a combined case-control and source attribution analysis. *PloS one.* 2014;9(2):e87933.
28. Martelli F, Davies RH. *Salmonella* serovars isolated from table eggs: An overview. *Food Res Int.* 2012;45(2):745-54.
29. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Divisão de Inspeção de Carnes e Derivados. Portaria n.1, de 21 fev. 1990. Normas gerais de inspeção de ovos e derivados. Brasília; 1990.
30. Freitas LWd, Paz ICdLA, Garcia RG, Caldara FR, Seno LdO, Felix GA, Lima NDdS, Ferreira VMOdS, Cavichiolo F. Aspectos qualitativos de ovos comerciais submetidos a diferentes condições de armazenamento. *Agrarian.* 2011;4(11):66-72.
31. Moraes D, Andrade M, Duarte S, Bastos T, Arnhold E, Jayme V, Nunes I. Phenotypic and molecular detection of *Salmonella* sp. On rowing, rearing and production phases in a commercial group of laying hens. *Pesq Vet Bras.* 2016;36(6):503-8.
32. Chen MH, Chiou CS, Chiang YC, Chen PH, Tsai SW, Tsen HY. Comparison of the pulsed field gel electrophoresis patterns and virulence profiles of the multidrug resistant strains of *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from chicken meat and humans in Taiwan. *Food Res Int.* 2012;45(2):978-83.
33. Galanis E, Lo Fo Wong D, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000–2002. *Emerg Infect Diseases.* 2006;3(12):381-8.
34. Li R, Lai J, Wang Y, Liu S, Li Y, Liu K, Shen J, Wu C. Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *Int J Food Microbiol.* 2013;163(1):14-8.
35. Chittick P, Sulka A, Tauxe RV, Fry AM. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. *J Food Prot.* 2006;69(5):1150-3.
36. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci.* 2008;86(14_suppl):E173-E87.
37. Flament A, Soubbotina A, Mainil J, Marlier D. Prevalence of *Salmonella* serotypes in male mule ducks in Belgium. *Vet Rec.* 2012;170(12).

38. Lai J, Wu C, Wu C, Qi J, Wang Y, Wang H, Liu Y, Shen J. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. *Int J Food Microbiol.* 2014;180:30-8.
39. Adzitey F, Rusul G, Huda N. Prevalence and antibiotic resistance of *Salmonella* serovars in ducks, duck rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Food Res Int.* 2012;45(2):947-52.
40. Meulen CJ, Dikken G. Criação de patos nas regiões tropicais: Agrodok Wageningen: Fundação Agromisa; 2003. 96 p.
41. Kudakwashe M, Dionne R, Grietjie D, Karen H, Karen H, Francis D. *Clinical Infectious Diseases*; 2015.
42. de Toro M, Seral C, Rojo-Bezares B, Torres C, Castillo FJ, Sáenz Y. Resistencia a antibióticos y factores de virulencia en aislados clínicos de *Salmonella enterica*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(1):4-10.
43. Pandini JA, Pinto FGS, Muller JM, Weber LD, Moura AC. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* sp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arq Inst Biol.* 2015;20:1-6.
44. Medeiros MAN, Oliveira DCNd, Rodrigues DdP, Freitas DRCd. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publica.* 2011;30(6):555-60.
45. Voss-Rech D, Vaz CSL, Alves L, Coldebella A, Leão JA, Rodrigues DP, Back A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. *Poult Sci.* 2015:peu081.
46. 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(11):1363-71.
47. European Food Safety Authority E, ECDC. Scientific Report of EFSA and ECDC. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA Journal.* 2015;13(2):178.
48. Sakaridis I, Soultos N, Iossifidou E, Koidis P, Ambrosiadis I. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars from chicken carcasses in northern Greece. *J Food Saf.* 2011;31(2):203-10.
49. Shanmugasundaram M, Radhika M, Murali HS, Batra HV. Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by selective amplification of *fliC*, *fljB*, *iroB*, *invA*, *rfbJ*, *STM2755*, *STM4497* genes by polymerase chain reaction in a monoplex and multiplex format. *World J Microbiol Biotechnol.* 2009;25(8):1385-94.
50. Hsu YM, Tang CY, Lin H, Chen YH, Chen YL, Su YH, Chen DS, Lin JH, Chang CC. Comparative study of class 1 integron, ampicillin, chloramphenicol,

streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various *Salmonella* serovars from humans and animals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2013;36(1):9-16.

51. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(8):608-20.

52. Antunes P, Machado J, Sousa JC, Peixe L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):836-9.

53. Van Hoek AH, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Robberts AP. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.* 2011;2:1-27.

CAPÍTULO 04 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A criação de patos é uma prática que está em expansão no Estado de Goiás e Distrito Federal, juntamente com o consórcio com outras aves, com destaque para as galinhas de postura e frangos. O aumento nas criações informais de patos, levam a uma consequente elevação na produção de ovos e carne, podendo contribuir para o aumento da transmissão de micro-organismos com potencial patogênico. A elevação na produção destas aves e seus produtos, inicialmente para o consumo de subsistência, geraram a necessidade de venda do excedente da produção, levando estes produtores a ofertarem seus produtos em feiras livres e pequenos estabelecimentos de venda de aves na periferia das grandes cidades como Goiânia, cidades limítrofes e em cidades do entorno de Brasília.

Pela falta de informações nos órgãos oficiais de defesa sanitária com relação à localização, acesso e identificação das criações informais de patos, o presente estudo pode contribuir para identificar parte destes produtores, assim como os principais municípios e feiras livres nas regiões estudadas que criam e comercializam estas aves.

Dentre as dificuldades encontradas no presente estudo, podemos destacar a falta de informação destas criações, o receio por parte dos criadores em participar da pesquisa pelo caráter da informalidade da criação e o medo de sofrerem sanções pelas autoridades sanitárias, fato este verificado com a suspensão na presente pesquisa do georreferenciamento das propriedades visitadas, sob pena de não participarem do estudo, já que viam nesta prática a possibilidade de serem identificados e localizados.

Outra dificuldade verificada nesta pesquisa foi com relação ao comércio destas aves e seus ovos, pois não se tem nenhum registro nos órgãos oficiais, não sofrendo, portanto, qualquer tipo de fiscalização, podendo representar risco à saúde pública.

Através da determinação do perfil produtivo, sanitário e por testes laboratoriais em amostras de ovos e patos de propriedades de criações informais no Estado de Goiás e no Distrito Federal, foi possível identificar isolados com padrões de multirresistência a antimicrobianos, mesmo não sendo prática comum entre os proprietários destas criações a utilização de antimicrobianos no tratamento dos anseriformes.

Salmonella é mundialmente conhecida como patógeno que causa enfermidade gastrointestinal pela ingestão de alimento contaminado. Portanto, este

estudo pode fornecer informações sobre o risco que os ovos destas criações informais, de feiras livres e comércios locais podem representar para a saúde pública, no tocante à transmissão desta bactéria.

Contudo, devido a utilização sem critérios destes fármacos, cepas de *Salmonella* resistentes a alguns destes antimicrobianos passaram a ser detectadas. Esta resistência, que pode ser produto de uma mutação ou adquirida, é uma característica preocupante para a saúde pública e para a sanidade animal.

A resistência adquirida horizontalmente causa uma maior preocupação, pois está relacionada a transmissão de diversos elementos gênicos carreadores de genes de resistência aos antimicrobianos. Estes elementos (como os plasmídeos, transposons, integrons e cassetes gênicos) são capazes de armazenar informações genéticas de resistência de uma célula doadora e depois transferir para uma célula receptora.

Deste modo, quando se pretende fazer o controle da propagação de genes de resistência aos antimicrobianos é importante conhecer a genética bacteriana, a biologia molecular dos diferentes mecanismos de transmissão de genes e as características ambientais onde os agentes estão localizados. Portanto, o acompanhamento contínuo desses genes em *Salmonella* é necessário para melhorar a compreensão da propagação da resistência dos micro-organismos.

Analisando os resultados desta pesquisa, pode-se observar que deve haver maior atenção por parte dos órgãos oficiais de controle sanitário, com elaboração de políticas públicas voltadas para criações informais que pelo momento político e econômico atual tendem a crescer desordenadamente, sem orientação técnica e manejo adequados.

O monitoramento dos ovos e das aves comercializadas livremente nas feiras, através do isolamento e identificação de possíveis patógenos, são práticas que devem ser adotadas para que a saúde dos consumidores seja preservada.

Os resultados do presente estudo serão disponibilizados para o órgão de defesa sanitária estadual, podendo colaborar na elaboração de programas específicos para as criações informais de patos e outras aves.

Diante do exposto, apesar da escassez de informações a respeito dos patos, a identificação de *Salmonella*, a determinação do perfil de resistência aos antimicrobianos de utilização na linha veterinária e humana, o conhecimento a respeito dos genes que conferem resistência bacteriana, assim como informações obtidas sobre as criações de patos através da presente pesquisa, poderão auxiliar os órgãos competentes na

elaboração normas, dando ênfase a melhoria no manejo e principalmente a sanidade destas aves.

ANEXO I



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 25 de maio de 2015.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO ATENDIMENTO DE
PENDÊNCIA DO PROTOCOLO N°. 001/15**

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. **Título do projeto:** *Salmonella* sp em anseriformes de criações domésticas em áreas antropizadas no estado de Goiás e Distrito Federal
2. **Pesquisador Responsável:** Denizard André de Abreu Delfino/Escola de Veterinária e Zootecnia /UFG.
3. **Unidade/Órgão do pesquisador:** Escola de Veterinária e Zootecnia /UFG.
4. **Pesquisadores Participantes:**

Nome/Endereço do Currículo Lattes	Instituição	Formação Básica	Titulação Mais Recente	Função na Pesquisa
Prof. Dr ^a Valéria de Sá Jayme/ Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/0603234425928309	UFG	Médica Veterinária	Doutorado	Orientadora, acompanhar a execução do projeto, auxiliando na compilação dos dados epidemiológicos, revisão bibliográfica
Prof. Dr ^a Maria Auxiliadora Andrade/ Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/9441751521255467	UFG	Médica Veterinária	Doutorado	Comitê de Orientação, acompanhar o projeto nas provas laboratoriais, no setor de Preventiva
Prof. Dr. Guido Fontgalland Coelho Linhares/ Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/6261928164195145	UFG	Médico Veterinário	Doutorado	Comitê de Orientação, acompanhar o projeto nas provas laboratoriais, no setor de Preventiva
Doutorando Denizard André de Abreu Delfino/ Endereço para acessar este CV: http://lattes.cnpq.br/3613389906366977	UFG	Médico Veterinário	Mestrado	Executor do Projeto. Aplicar questionários, colheita e processamento laboratorial de material

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Inovação/PRPI-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1876.
Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



5. **Unidade onde será realizado:** A colheita do material biológico (amostra de sangue, suabes de traquéia e suabes de cloaca) será realizada em 38 propriedades rurais com criações domésticas no Estado de Goiás e Distrito Federal e estes animais serão soltos em seus próprios locais de captura. As análises dos materiais serão realizadas nos Laboratórios de Bacteriologia e de Biologia Molecular do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ) da Universidade Federal de Goiás (UFG).
6. **Data de apresentação do protocolo a CEUA:** 15 de janeiro de 2015
7. **Data de Atendimento das Pendências:** 07 de maio de 2015

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a *Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA* da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou** o projeto acima referido e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPI-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-CONCEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, **prevista para conclusão em dezembro de 2015.**

III - Data da reunião: 25 de maio de 2015

2015.06.09

15:45:09 -03'00'

Dra. Renata Mazaro e Costa
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

ANEXO II



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UFG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Você/Sr./Sra. (ou o/a seu filho/filha).....
está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a), da pesquisa intitulada
"Salmonella SP EM ANSERIFORMES DE CRIAÇÕES DOMÉSTICAS EM ÁREAS
ANTROPIZADAS NO ESTADO DE GOIÁS E DISTRITO FEDERAL.

Meu nome é Denizard André de Abreu Delfino, sou o pesquisador responsável e minha área de atuação é Sanidade Animal. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, se você aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence ao pesquisador responsável.

Esclareço que em caso de recusa na participação você não será penalizado (a) de forma alguma. Mas, se aceitar participar, as dúvidas sobre a pesquisa poderão ser esclarecidas pelo(s) pesquisador (es) responsável(is), via e-mail (denizarddelfino@yahoo.com.br – valeria.mg@uol.com.br) e, inclusive, sob forma de ligação a cobrar, através do(s) seguinte(s) contato(s) telefônico(s): (62)9929-1263/(62)9320-6367. Se persistirem as dúvidas sobre os seus direitos como participante desta pesquisa, você também poderá fazer contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, pelo telefone (62)3521-1215.

O título da pesquisa é "Salmonella SP EM ANSERIFORMES DE CRIAÇÕES DOMÉSTICAS EM ÁREAS ANTROPIZADAS NO ESTADO DE GOIÁS E DISTRITO FEDERAL"

O objetivo principal é pesquisar a ocorrência de bactérias do gênero *Salmonella* sp. em anseriformes (patos e marrecos) oriundos de explorações de subsistência e em ovos comercializados no Estado de Goiás e Distrito Federal.

Os patos e marrecos serão capturados pelos proprietários e colaboradores e colocados em viveiros ou cercados coletivos. Após a captura, as aves serão retiradas manualmente e acomodadas em gaiolas específicas.

As salmoneloses são intensamente pesquisadas e monitoradas em aves de corte e postura, porém, no Estado de Goiás e no Distrito Federal são escassos os estudos envolvendo a participação dessas aves da ordem anseriforme na sua cadeia epidemiológica.

Espera-se com este trabalho obter a ocorrência da infecção por *Salmonella* sp. em anseriformes (patos e marrecos). A identificação de patos e marrecos portadores desta bactéria trará suporte para a realização de procedimentos de rotina relativos a medidas de biossegurança das criações domésticas e comerciais.

Após a identificação das aves será feita a colheita de sangue e swabes por dois profissionais. Os anseriformes (patos e marrecos) serão fornecidos pelos proprietários rurais de 38 propriedades, agrupados em um lote de aproximadamente 12 animais por propriedade, contudo, estes animais não sairão

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – Telefone – 55 62-35211586



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UFG

das propriedades e logo após a colheita do material biológico (amostra de sangue, suab de traquéia e suab de cloaca) estes animais serão soltos em seus locais de captura.

Eu, _____, inscrito(a) no RG/CPF/n.º _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo intitulado "*Salmonella* SP EM ANSERIFORMES DE CRIAÇÕES DOMÉSTICAS EM ÁREAS ANTROPIZADAS NO ESTADO DE GOIÁS E DISTRITO FEDERAL".

Informo ter mais de 18 anos de idade, e destaco que minha participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Fui, ainda, devidamente informado(a) e esclarecido(a), pelo pesquisador(a) responsável Doutorando Denizard André de Abreu Delfino, sobre a pesquisa, os procedimentos e métodos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação no estudo. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer penalidade.

Declaro, portanto, que concordo com a minha participação no projeto de pesquisa acima descrito.

Goiânia, de de

Participante - Colaborador

Doutorando Denizard André de Abreu Delfino

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL – Telefone – 55 62-35211586



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA UFG

Testemunhas em caso de uso da assinatura datiloscópica



ANEXO III

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

Questionário sobre manejo de aves (patos) em propriedades de criações informais no Estado de Goiás e no Distrito Federal

Nome do proprietário:-

Propriedade:-

Município:..... Data da Visita:

01- Finalidade da criação:

Subsistência Comercial Lazer

02- Espécies de aves criadas:

Galinhas Patos Marrecos Ornamentais

03- Número de patos e marrecos na criação:

Até 20 21 a 40 41 a 80 acima de 80

04- Número de aves mortas nos seis meses anteriores:

0 a 5 6 a 10 11 a 20 acima de 21

05- Alimentação utilizada para as aves:

Caseira Comercial Semicomercial Milho

Capim.

06- Origem da água utilizada:

- Lagoa Água corrente Água tratada
 Represa

07- Aquisição dos patinhos:

- Aquisição da casa comercial Da propriedade

08- Como é feita a incubação:

- Natural (galinha-pata) Chocadeira

09- Em caso de morte de aves o destino das carcaças:

- Fossa Séptica Enterra Queima Joga fora (especificar o local).....

10- Controle de endoparasitas:

- Sim. Qual produto:.....
 Não.

11- Controle de ectoparasitas:

- Sim. Qual produto:.....
 Não.

12- Existência de abrigos para as aves:

- Sim. Galpão Abrigo rústico
 Soltos
 Não.