

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos



Dissertação

**OCORRÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE
Salmonella spp. ISOLADAS EM FRIGORÍFICOS-MATADOUROS NO
SUL DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL**

Luana Tombini Decol

Pelotas, 2013

LUANA TOMBINI DECOL

Ocorrência e caracterização fenotípica e molecular de *Salmonella* spp. isoladas em frigoríficos-matadouros no sul do Rio Grande do Sul, Brasil

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Wladimir Padilha da Silva

Co-Orientador: Dr. Ângela Maria Fiorentini

Pelotas, 2013

**Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo - CRB: 10 / 744)**

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

D296o Decol, Luana Tombini
Ocorrência e caracterização fenotípica e molecular de *Salmonella* spp. isoladas em frigoríficos-matadouros no sul do Rio Grande do Sul, Brasil / Luana Tombini Decol; Dr. Wladimir Padilha da Silva, orientador; Dr. Ângela Maria Fiorentini, co-orientador. - Pelotas, 2013.

73 f.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1. *Salmonella* spp.. 2. susceptibilidade antimicrobiana. 3. carcaça bovina. 4. genes de virulência. 5. manipulador. 6. PFGE. I. Silva, Dr. Wladimir Padilha da , orient. II. Fiorentini, Dr. Ângela Maria , co-orient. III. Título.

CDD: 664

Banca Examinadora:

Dr. Wladimir Padilha da Silva (Orientador)

Dra. Eduarda Hallal Duval

Dr. Marcelo Mendonça

AGRADECIMENTOS

A Deus por todas as graças recebidas e por iluminar meu caminho.

A minha família, especialmente aos meus pais Nelson Decol e Claé Terezinha Tombini Decol por todo o apoio e amor incondicional dispensado.

Ao professor Dr. Wladimir Padilha da Silva pela confiança em mim depositada, assim como pela orientação, paciência, ensinamentos, amizade e apoio, que foram de suma importância para a realização deste trabalho.

As minhas colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo companheirismo e palavras de incentivo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) da FAEM/UFPel, por me oportunizar a realização do mestrado.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Aos professores do PPGCTA da FAEM/UFPel por todos os ensinamentos transmitidos durante o decorrer do curso.

A amiga e colega de pesquisa Mariana Iglesias pelo auxílio, sugestões ao trabalho e amizade.

As colegas Tatiane Kuka Valente Gandra, Mauricéia Greici de Oliveira e as estagiárias Joline Dalla Vecchia, Maiara Dorneles Minuzzi pela colaboração na execução do projeto.

Aos amigos e colegas do PPGCTA da FAEM/UFPel Michelle Nogueira, Melina Gomes, Guilherme Dannenberg, Fábio José Mattei e Karla Sequeira

Mendonça pelas dicas de trabalho, amizade e agradável convívio durante o decorrer do curso.

A equipe do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária/UFRGS, em especial a Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso e Vanessa Dias, que disponibilizaram local e auxílio para a execução de análises.

Aos colegas de mestrado do PPGCTA da FAEM/UFPel pela amigável convivência durante as disciplinas.

Aos membros da banca Dra. Eduarda Hallal Duval e Dr. Marcelo Mendonça por se disporem a participar da banca examinadora desta dissertação.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

RESUMO

DECOL, L. T. **Ocorrência e caracterização fenotípica e molecular de *Salmonella* spp. isoladas em frigoríficos-matadouros no sul do Rio Grande do Sul, Brasil.** 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

No Brasil a pecuária de corte possui grande importância na economia, tanto interna, quanto em nível de exportação. A qualidade e a segurança dos produtos cárneos são essenciais para que o Brasil permaneça como exportador competitivo no mercado internacional. Atualmente, critérios microbiológicos são usados para avaliar produtos cárneos, e *Salmonella* spp. tem sido usada como importante indicador de segurança de alimentos em diversos países. O presente estudo objetivou verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em dois frigoríficos-matadouros com diferentes níveis de inspeção (Estadual e Federal) do sul do Rio Grande do Sul e, a partir dos isolados, avaliar sua sensibilidade a antimicrobianos, e realizar a caracterização genotípica, através da verificação de genes de virulência e da macrorestrição por PFGE. Foram avaliadas 200 carcaças bovinas em quatro pontos críticos da linha de abate (após a sangria, após a esola, após a evisceração e após a lavagem pré-resfriamento), totalizando 800 amostras, e 10 amostras de *mix* de lavagem das mãos dos manipuladores (antes e durante o abate), estas apenas no frigorífico com Inspeção Estadual. A ocorrência de *Salmonella* spp. nas carcaças foi de 8%, a qual foi detectada somente no ponto após a sangria, onde a coleta era realizada no couro do animal, e em uma amostra (10%) das mãos dos manipuladores durante as atividades da sala de cortes cárneos. Foram obtidos 17 isolados de *Salmonella* spp., os quais foram confirmados em nível de gênero através de PCR, utilizando os genes *invA* e *hilA*. Houve a prevalência do sorovar *S. Senftenberg* (41,17%). Os 17 isolados foram avaliados quanto a sensibilidade a 15 antimicrobianos, dos quais, 23,53% apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano (tetraciclina, sulfonamida, ampicilina, cefoxitina, cefalotina) e um apresentou resistência intermediária a estreptomicina. Com relação aos genes de virulência *sefA*, *pefA* e *spvC* observou-se que nenhum isolado carregava esses genes. O perfil de macrorestrição por PFGE, utilizando a endonuclease *Xba*I, demonstrou oito perfis genéticos distintos, sendo a maioria constituída por apenas um isolado. Esse resultado demonstra a grande diversidade genética de isolados de *Salmonella* spp. que são carregados pelo couro de bovinos e que podem entrar na planta de processamento, podendo persistir no ambiente de abate e de processamento.

Palavras-chave: *Salmonella* spp.. carcaça bovina. manipulador. susceptibilidade antimicrobiana. genes de virulência. PFGE.

ABSTRACT

DECOL, L. T. **Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* spp. isolated from refrigerated slaughterhouses in southern Rio Grande do Sul, Brazil.** 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

In Brazil beef cattle has an economical importance, since it's consumed by intern market and exported. Brazil is the world leader in beef exports, and the quality and safety of meat products are essential for the country to remain competitive as an exporter in the international market. Currently, microbiological criteria are used to evaluate meat products, and *Salmonella* spp. has been used as an important indicator of food safety in many countries. This study aimed to verify the occurrence of *Salmonella* spp. in two slaughterhouses with different inspection levels (state and federal) in southern Rio Grande do Sul, and through the isolates, asses their sensibility to antimicrobials and make their phenotypical characterization by checking virulence genes and by PFGE macrorestriction. Two-hundred cattle carcasses were evaluated in four critical points of the slaughter line (after bleeding, after skinning, after evisceration and after washing pre-cooling), resulting in 800 samples. Ten samples of hand washing mix of operators (before and during slaughter) from the state inspection level slaughterhouse were also evaluated. *Salmonella* spp. occurred in 8% of the samples, detected after bleeding at the point where the collect was held in the leather of the animal, and also in one sample (10%) of employees' hands during the slaughter process. Seventeen *Salmonella* spp. isolates were obtained, and the confirmation of the genus was performed by PCR using the *invA* gene and *hlyA*. There was a prevalence of serovar S. Senftenberg (41.17%). These 17 isolates were analyzed for susceptibility to 15 antimicrobials recommended by the CLSI. Of these, 23.53% were resistant to more than one antimicrobial, namely, tetracycline, sulfonamide, ampicilina, cefoxitin, cephalothin and showed intermediate resistance to streptomycin. The presence of virulence genes *sefA*, *pefA* and *spvC* was evaluated by PCR, and the presence of these genes was not detected in the isolates. The macrorestriction using the endonuclease *XbaI* PFGE showed that the isolates express eight different genetic profiles, and the majority of profiles is from a single isolated. This fact shows a large genetic diversity of *Salmonella* spp. isolates from cattle leather in southern Rio Grande do Sul that can enter the processing chain and so persist in the slaughter and processing environment.

Keywords: *Salmonella* spp., cattle carcass, operators' hands, antimicrobial susceptibility, virulence genes, PFGE.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema representativo indicando os pontos (*) onde realizou-se o esfregão em superfície na carcaça inteira e após a divisão da meia-carcaça..... 32
- Figura 2 Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene *hilA* (413pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 *S. Typhimurium* ATCC 14028, controle positivo; canaleta 3: *S. Diarizonae*; canaleta 4: *S. Derby*; canaletas 5 e 8: *S. Enterica* (O:6,7); canaleta 6: *S. Livingstone*; canaleta 7: *S. Ohio*; canaletas de 9 a 15: *S. Senftenberg*; canaletas 16 e 18: *S. Muenster*; canaletas 17 e 19: *S. Anatum*; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: *L. monocytogenes* ATCC 7644, controle negativo..... 40
- Figura 3 Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene *invA* (521 pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 *S. Typhimurium* ATCC 14028, controle positivo; canaleta 3: *S. Diarizonae*; canaleta 4: *S. Derby*; canaletas 5 e 8: *S. Enterica* (O:6,7); canaleta 6: *S. Livingstone*; canaleta 7: *S. Ohio*; canaletas de 9 a 15: *S. Senftenberg*; canaletas 16 e 18: *S. Muenster*; canaletas 17 e 19: *S. Anatum*; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: *L. monocytogenes* ATCC 7644, controle negativo..... 40
- Figura 4 Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene *spvC* (669 pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 *S. Typhimurium* ATCC 14028, controle positivo; canaleta 3: *S. Diarizonae*; canaleta 4: *S. Derby*; canaletas 5 e 8: *S. Enterica* (O:6,7); canaleta 6: *S. Livingstone*; canaleta 7: *S. Ohio*; canaletas de 9 a 15: *S. Senftenberg*; canaletas 16 e 18: *S. Muenster*; canaletas 17 e 19: *S. Anatum*; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: *L. monocytogenes* ATCC 7644, controle negativo..... 41

Figura 5	<p>Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene <i>sefA</i> (330 pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 <i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076, controle positivo; canaleta 3: <i>S. Diarizonae</i>; canaleta 4: <i>S. Derby</i>; canaletas 5 e 8: <i>S. Enterica</i> (O:6,7); canaleta 6: <i>S. Livingstone</i>; canaleta 7: <i>S. Ohio</i>; canaletas de 9 a 15: <i>S. Senftenberg</i>; canaletas 16 e 18: <i>S. Muenster</i>; canaletas 17 e 19: <i>S. Anatum</i>; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644, controle negativo.....</p>	41
Figura 6	<p>Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene <i>pefA</i> (497 pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 <i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028, controle positivo; canaleta 3: <i>S. Diarizonae</i>; canaleta 4: <i>S. Derby</i>; canaletas 5 e 8: <i>S. Enterica</i> (O:6,7); canaleta 6: <i>S. Livingstone</i>; canaleta 7: <i>S. Ohio</i>; canaletas de 9 a 15: <i>S. Senftenberg</i>; canaletas 16 e 18: <i>S. Muenster</i>; canaletas 17 e 19: <i>S. Anatum</i>; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644, controle negativo.....</p>	42
Figura 7	<p>Dendrograma obtido através da técnica de PFGE indicando a relação genética entre 13 isolados de <i>Salmonella</i> spp. obtidos de carcaças bovinas e mão de manipuladores em dois frigoríficos-matadouros da região sul do Rio Grande do Sul. Legenda: Grupo A (P1, P2, P3, P5), Grupo B (P6, P7, P8), Grupo C (P4).....</p>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência de oligonucleotídios iniciadores utilizados na pesquisa de genes nos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	35
Tabela 2	Identificação, origem e sorovares dos isolados de <i>Salmonella</i> spp. provenientes de carcaças bovinas e mãos de manipuladores em frigoríficos-matadouros da região sul do Rio Grande do Sul.....	38
Tabela 3	Perfil de sensibilidade dos antimicrobianos em isolados de <i>Salmonella</i> spp. provenientes de carcaças bovinas e mãos de manipuladores em frigoríficos-matadouros no sul do Rio Grande do Sul.....	43

Sumário

Introdução	11
Revisão da Literatura	13
Artigo - Ocorrência e caracterização fenotípica e molecular de <i>Salmonella</i> spp. isoladas em frigoríficos-matadouros no sul do Rio Grande do Sul, Brasil.	29
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Resultados.....	38
Discussão.....	46
Conclusões.....	51
Agradecimentos.....	52
Referências Bibliográficas.....	52
Conclusões	57
Referências	58
Anexos	68

1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. O Brasil possui o segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, e é responsável por um quinto da carne comercializada internacionalmente (MAPA, 2013; ASPNP, 2013). Um rápido crescimento neste mercado vem ocorrendo nos últimos anos e, no ano de 2012, houve um recorde histórico nas exportações de carne bovina brasileira. Mesmo com uma conjuntura macroeconômica desfavorável, o Brasil conseguiu aumentar o volume de carne exportado em 12,25%, de janeiro a novembro de 2012, comparado ao mesmo período do ano anterior (ABIEC, 2013).

Em face da importância da carne como alimento, e para garantir a competitividade nas exportações para mercados mais exigentes, é indispensável a garantia de atributos intrínsecos de qualidade do alimento, como maciez, sabor e quantidade de gordura. Entretanto, características de ordem ou natureza voltadas para as formas de produção do alimento, utilização do meio ambiente, processamento e comercialização que garantem a vida útil destes produtos no mercado através da manutenção da qualidade microbiológica, também têm grande importância (ASPNP, 2013).

A carne, por suas características intrínsecas, como composição química, elevada atividade de água e pH próximo a neutralidade, é um excelente substrato para a multiplicação de inúmeros micro-organismos, tanto patogênicos como deteriorantes (NADVORNY et al., 2004). Outrossim, está exposta à contaminações de natureza microbiana em todas as fases do seu processamento tecnológico, particularmente nas operações onde ocorre maior manipulação e sempre que não são tomados cuidados especiais em relação às Boas Práticas de Higiene (PARDI et al., 2001; SOFOS, 2008).

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos causa grande preocupação, pois além de estarem amplamente distribuídas na natureza, tendo como principal habitat o trato intestinal do homem e animais de sangue quente, se enquadram no grupo dos micro-organismos patogênicos causadores de infecções alimentares (TARWATE et al., 1993; ALLERBERGER et al., 2002; JAY, 2005).

Em humanos, *Salmonella* spp. é uma das causas mais comuns de gastroenterites bacterianas (MEAD et al., 1999; WHO, 2013) e tem sido associada ao consumo de diversos alimentos, incluindo a carne bovina (FONTAINE et al., 1978).

Os animais carregam um vasto e variado número de micro-organismos provenientes do ambiente de criação, da alimentação, do solo e da água para o ambiente de abate e processamento (SABA, 2006). A identificação de pontos favoráveis à contaminação por micro-organismos potencialmente patogênicos, como *Salmonella* spp., nas operações de abate de bovinos e processamento da carne bovina vem a contribuir de forma significativa com a implementação de medidas preventivas e de monitoramento em programas de qualidade e, conseqüentemente, com a redução de riscos à saúde do consumidor.

Desta forma, para consolidação do país como produtor e exportador de carne e de produtos cárneos, faz-se necessária a implementação de estudos para traçar um perfil epidemiológico dos micro-organismos patogênicos que podem estar presentes no ambiente de abate e na carne bovina brasileira.

Neste contexto, este estudo foi realizado para verificar a qualidade microbiológica, através da pesquisa de *Salmonella* spp., em carcaças bovinas abatidas em dois frigoríficos-matadouros, sendo um com Inspeção Sanitária Federal e, outro, com Inspeção Sanitária Estadual, e em mãos de manipuladores na linha de processamento de cortes cárneos no frigorífico com Inspeção Estadual. Avaliou-se o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de uso em terapêutica veterinária e humana. Além disso, estudou-se a presença de genes de virulência e o perfil genotípico, pelo emprego da técnica de PFGE, nos isolados de *Salmonella* spp.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bovinocultura brasileira

No Brasil, a bovinocultura, especialmente de corte, fez-se presente desde os primórdios da colonização, estabelecendo marcas no processo de ocupação e desenvolvimento do País. Entretanto, inicialmente a carne era produzida voltada ao mercado interno, sendo exportada apenas em poucas exceções ou momentos de crise internacional. A partir dos anos 90 ocorreu uma ampliação da demanda externa pela carne bovina brasileira e a sua consolidação no mercado internacional (ALMEIDA; MICHELS, 2012).

Atualmente, o Brasil, consolidou-se como principal produtor e exportador de proteína de origem animal e, desde 2004, assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e venda em mais de 180 países (MAPA, 2013). Em 2011, foram exportados 16,5% da produção nacional, dos quais, 71% foram comercializados *in natura*, 17% na forma industrializada e 11% em miúdos e outros (ABIEC, 2011).

No ano de 2012, o Brasil obteve um recorde histórico nas exportações de carne bovina, e mesmo com uma conjuntura macroeconômica desfavorável, conseguiu aumentar o volume exportado de janeiro a novembro de 2012 em 12,25%, comparado ao mesmo período do ano anterior (ABIEC, 2013).

Os maiores mercados importadores da carne bovina brasileira em faturamento no ano de 2012 foram Rússia (19%), Hong Kong (14%), União Europeia (14%), Egito (10%); Venezuela (8%), Chile (7%), Irã (6%), Estados Unidos (3%), Arábia Saudita (3%) e Líbano (1%) (ABIEC, 2013).

O consumo da carne bovina é um hábito consolidado no Brasil e vem aumentando a cada ano. O mercado interno é responsável pelo consumo de 83,5% da produção e o consumo per capita é de 40kg/ano (ABIEC, 2013), o que torna o Brasil o quarto maior consumidor per capita de carne bovina, atrás somente dos Estado Unidos, Argentina e Uruguai. Este mercado consumidor apresenta um dos maiores potenciais de crescimento na atualidade, decorrente principalmente, da melhoria do potencial de compra dos brasileiros e do aumento da capacidade da cadeia produtiva para se adequar ao consumo crescente (ZEN, 2011).

O Brasil apresenta vocação para continuar liderando o mercado mundial de carne bovina. Contudo, se faz necessário lutar pela abertura de novos mercados, notadamente daqueles dispostos a remunerar a qualidade, como Estados Unidos, Japão, Coréia do Sul, entre outros. Nesse sentido, é importante que o Brasil retome a exportação para União Europeia.

2.2 Microbiologia da carne

A carne, por suas características intrínsecas, como composição química, elevada atividade de água e pH próximo a neutralidade, é um excelente substrato para a multiplicação de inúmeros micro-organismos, tanto patogênicos como deteriorantes (NADVORNY et al., 2004). Até o momento do abate, os tecidos dos animais sadios podem ser considerados estéreis, com exceção da superfície externa, mucosas e vísceras, porém, após, inicia-se a contaminação (PARDI et al., 2001).

Para reduzir a contaminação na linha de abate a partir dos animais abatidos, é importante que haja a denominada "abordagem logística de abate", ou seja, transportar animais livres de patógenos, antes de chegarem ao abatedouro. (SWANENBURG et al., 2001). Dessa maneira, o manejo higiênico-sanitário dos animais inicia-se nas fazendas, e não somente no momento do abate. No abate e processamento de produtos de origem animal, como a carne bovina, os animais carregam um vasto e variado número de micro-organismos provenientes do ambiente de criação, da alimentação, do solo e da água (SABA, 2006).

Durante o abate as etapas de esfolagem, evisceração e pré-resfriamento são os principais pontos de contaminação microbiana a serem controlados. A esfolagem é uma das etapas mais críticas, pois a superfície do couro, pêlos, patas e úbere dos animais estão impregnados de sujidades que podem veicular grande quantidade de micro-organismos para a superfície da carcaça, as quais podem ser evitadas tomando-se medidas preventivas durante o abate (PARDI et al., 2001).

Dessa forma, considerando que a principal fonte de contaminação da carne com micro-organismos deteriorantes e patogênicos é o próprio animal, a maneira mais eficiente de reduzir a carga microbiana nos produtos cárneos é a implementação de programas de qualidade como os Programas de Auto-Controle, Programa de Redução de Patógenos (PRP) e o sistema de Análise de Perigos e

Pontos Críticos de Controle (APPCC), durante os processos de abate, os quais podem minimizar os riscos de contaminação cruzada e disseminação dos micro-organismos na planta de processamento.

O controle e o monitoramento estrito de todas as operações, além de minimizar a contaminação microbiana das carcaças, pode evitar sérios danos à saúde do consumidor, garantir maior vida útil aos produtos, além de novos mercados consumidores aos produtos brasileiros (ROÇA; SERRANO, 1994; SABA, 2006).

Entre os micro-organismos patogênicos encontrados na carne bovina merecem destaque: *Salmonella* spp., *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp. (FRANCO et al., 2010).

Em 1994, a Organização Mundial de Saúde (OMS) assinou um Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias, cuja principal consequência foi a compreensão da necessidade de utilização de uma nova ferramenta para se avaliar o impacto dos micro-organismos contaminantes de alimentos na saúde da população, chamada Análise de Risco, e o Codex Alimentarius seria o fórum encarregado de fornecer os subsídios técnico-científicos para sua implementação (CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

De acordo com o Codex Alimentarius (1999), a avaliação de risco microbiológico se inicia com a determinação da combinação patógeno-alimento a ser considerada e é constituído das seguintes etapas: (i) identificação do perigo microbiológico; (ii) caracterização deste perigo; (iii) avaliação da exposição e (iv) caracterização do risco.

Na maioria dos países, inclusive no Brasil, avaliações de risco microbiológico são difíceis de serem realizadas devido às inúmeras lacunas, com destaque para a fragilidade dos dados quantitativos a respeito da prevalência dos micro-organismos patogênicos de relevância na cadeia produtiva de carnes, bem como dados sobre o seu comportamento durante as etapas do abate e sua disseminação nas plantas de processamento (SANT'ANA; FRANCO, 2009).

Cabe ao MAPA, por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária, regulamentar e controlar alimentos de origem animal a serem exportados, atestando sua qualidade e segurança. Além disso, o MAPA, com as Secretarias de Agricultura Estaduais, promove ampla fiscalização, visando à conformidade entre a legislação

de inspeção industrial e sanitária brasileira e as normas de sanidade exigidas pelo país importador (MAPA, 2013).

Em face da importância como alimento e para garantir a competitividade nas exportações da carne bovina brasileira *in natura* e seus derivados para mercados mais exigentes, é indispensável a garantia das normas exigidas pelo país importador. Os Estados Unidos exigem execução diária de testes microbiológicos para *E. coli* e *Salmonella* spp., e para o mercado Europeu, são exigidas informações sobre indicadores de qualidade e de segurança microbiológica, como a enumeração total de micro-organismos aeróbios e de *Enterobacteriaceae*, além da pesquisa de *Salmonella* spp. (COMMISSION REGULATION, 2005).

Para o mercado interno, os padrões microbiológicos atuais da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (BRASIL, 2001) não fazem referência à enumeração de micro-organismos indicadores de higiene, porém, exigem para carnes resfriadas ou congeladas e, *in natura*, de bovinos, ausência de *Salmonella* spp. em 25 gramas de produto.

Assim sendo, cada país prioriza alguns aspectos do ponto de vista técnico e sanitário, mas de maneira geral, todos buscam alimentos seguros.

2.3 *Salmonella* spp.

2.3.1 Características gerais

O gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, possui uma classificação taxonômica complexa, sendo dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. Porém, a partir de 2004, foi proposta a inclusão de uma terceira espécie, *S. subterranea*, que foi isolada de sedimento coletado de região aquífera em Oak Ridge, nos Estados Unidos (SHELOBOLINA et al., 2004; BAILEY et al., 2010). Como esta espécie apresenta 96,4% de similaridade com *S. bongori*, não há um consenso entre a comunidade científica se é uma nova espécie ou não (BAILEY et al., 2010). As espécies e subespécies podem ser distinguidas com base em características bioquímicas e genéticas.

Salmonella enterica é subdividida em 6 subespécies designadas por nomes ou algarismos romanos, que são diferenciados por reações bioquímicas e genômicas entre si, *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie

salamae (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subespécie *houtenae* (IV), *S. enterica* subespécie *indica* (VI). Enquanto que *S. bongori* apresenta uma subespécie *bongori* (V) (POPOFF, 2001, GUIBOURDENCHE et al., 2010).

O gênero *Salmonella* contém muitos sorovares, os quais são determinados de acordo com os antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) presentes. Atualmente, são conhecidos mais de 2.500 sorovares diferentes, dos quais o maior número é formado pela espécie *S. enterica* subsp. *enterica*, a qual também possui o maior número de sorovares responsáveis por enfermidades em humanos e animais (POPOFF; LE MINOR, 2005; BAILEY et al., 2010; CDC, 2013a; TAVECHIO et al., 2002).

Quanto a nomenclatura do gênero *Salmonella*, o código Internacional de Nomenclatura Bacteriana adotada pelo *Center of Disease Control and Prevention* – CDC, descreve gênero, espécie, subespécie e sorovar, como por exemplo: *Salmonella enterica* (gênero e espécie), subespécie *enterica* (subespécie I) sorovar Typhimurium ou, apenas, *Salmonella* Typhimurium. Os sorovares das outras subespécies (II a VI) ou da espécie *bongori* (V) são designados unicamente pelas fórmulas anfigênicas, por exemplo: *Salmonella* II 17: b: z 26; *Salmonella* IIIa 42: I, v: z (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Dentre as características fenotípicas o gênero *Salmonella* se apresenta como: bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos e móveis pela produção de flagelos peritríquios, exceção feita aos sorovares Pullorum e Gallinarum. Como outros membros da família *Enterobacteriaceae*, fermentam glicose, são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono, produzem H₂S, reduzem nitratos a nitritos, não hidrolisam ureia e não produzem citocromo oxidase (BOPP, 1999; FORBES; SAHM; WEISSFELD, 2002; MACFADDIN, 2000). São micro-organismos mesófilos, com crescimento ótimo na faixa de 35°C a 40°C, sendo sua temperatura ótima 37°C, pH ótimo na faixa entre 6,5 e 7,5 e atividade de água com valores entre 0,94 e 0,99 (JAY, 2005).

Salmonella spp. se encontram distribuídas na natureza, mas seu habitat natural é o trato intestinal do homem e dos animais de sangue quente e frio. Os humanos e os animais representam, na cadeia epidemiológica, os papéis de

reservatório, portador assintomático e enfermo (ALLERBERGER et al., 2002; JAY, 2005).

Alguns sorovares de *Salmonella* são adaptados a hospedeiros específicos, como *S. Typhi* para humanos, *S. Choleraesuis* para suínos e *S. Dublin* para bovinos (SCHWARTZ, 2000), enquanto outros como *S. Typhimurium*, *Anatum* e *Newport*, entre outros, afetam um grande número de hospedeiros, desempenhando importante papel na disseminação da infecção entre as diferentes espécies (HIRSH, 1990)

2.3.2 Doenças causadas por *Salmonella* spp.

As doenças causadas por *Salmonella* spp. podem ser subdivididas em três grupos:

A) **Febre tifóide:** doença bacteriana aguda causada por *S. Typhi*. É transmitida através da ingestão de alimentos ou bebidas contaminados pelas fezes ou urina de pessoas infectadas. Seus sintomas geralmente se desenvolvem 1-3 semanas após a exposição e podem ser de leves à graves. Eles incluem febre alta, letargia, cefaléia, constipação ou diarreia, erupções cutâneas com coloração rosa, e aumento do baço e do fígado. Seu tratamento é realizado com antibióticos, contudo, a resistência aos antimicrobianos comuns é generalizada. Alguns indivíduos podem se tornar portadores assintomáticos do micro-organismo por meses e sua taxa de letalidade é em torno de 10%;

B) **Febre paratifóide:** doença semelhante à febre tifóide, mas é causada por *S. Paratyphi* A e C e possui uma sintomatologia mais branda. Geralmente cursa com septicemia, febre e diarreia com duração máxima de 3 semanas;

C) **Salmonelose** (gastroenterite ou enterocolite): é a forma clínica mais comum causada pelos sorovares não tifóides. A maioria das pessoas infectadas desenvolvem diarreia, febre, cólicas abdominais e vômito, e os sintomas podem aparecer de 12 a 72 horas após a infecção. Na maioria dos casos, com a duração dos sintomas é de 4-7 dias, não sendo necessária hospitalização. Em casos mais severos pode ser necessária hospitalização e antibioticoterapia e, em casos raros, a infecção por *Salmonella* pode desenvolver condições clínicas crônicas como artrites

e Síndrome de Reiter (WHO, 2013; GIANNELLA, 2006; PEQUES; MILLER, 2009; CDC, 2013a).

Segundo Jay (2005) a dose infectante de *Salmonella* spp. pode variar de 10^7 a 10^9 célula.g⁻¹, dependendo do estado imunológico do hospedeiro, da virulência do sorovar e da composição química do alimento carreador.

2.4 Patogenicidade e genes de virulência

Patogenicidade é definida como a capacidade de um micro-organismo de causar doença. Os micro-organismos patogênicos se distinguem de outros não patogênicos, pelo fato de possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, isto é, fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira, ocasionando o aparecimento de sinais e sintomas anormais, que irão, finalmente, definir o estado de doença (VIEIRA, 2009).

As salmonelas entram no hospedeiro via fecal-oral, e são capazes de sobreviver a passagem pelo estômago, apesar do baixo pH, e de colonizar o epitélio intestinal. Para o patógeno sobreviver a todas estas condições hostis, ele utiliza uma série de fatores de virulência, e assim tem capacidade de resistir as barreiras de defesa do hospedeiro (FERREIRA; CAMPOS, 2008; PARDI et al., 2001).

A virulência da *Salmonella* spp. é altamente complexa, necessitando a expressão de numerosos genes, os quais codificam para toxinas, adesinas, invasinas e outros fatores de virulência. Estes fatores estão localizados em regiões específicas no cromossoma bacteriano, chamadas de Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI – *Salmonella Pathogenicity Island*). Estas ilhas estão presentes no genoma de sorovares patogênicos de determinadas espécies, mas ausentes ou presentes, não sendo expressas, em variantes não patogênicas da mesma espécie (HACKER et al., 1997).

As Ilhas de Patogenicidade são segmentos de DNA inseridos no cromossomo bacteriano, que atribuem uma variedade de características de virulência aos micro-organismos que as possuem (GROISMAN; OCHMAN, 1996; MARCUS et al., 2000). Atualmente, sabe-se que *Salmonella* spp. conta com 17 ilhas de Patogenicidade que codificam os mais importantes fenótipos de virulência (SAROJ et al., 2008). A grande quantidade de Ilhas de Patogenicidade identificadas

é uma indicação da capacidade de adaptação desta bactéria. Acredita-se que estes genes tenham sido adquiridos de outras espécies bacterianas através da transferência horizontal (MAUER, 2007).

A Ilha de Patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI-1) contém genes que codificam o sistema de secreção tipo III que é constituído por um complexo de proteínas responsáveis pela adesão e invasão celular, assim como os genes relacionados com a produção de toxinas.

Os genes presentes nas regiões SPI-2, SPI-3 e SPI-4 são necessários para a sobrevivência e multiplicação do patógeno no hospedeiro. A SPI-5 está relacionada com a resposta inflamatória e secreção de íons cloreto, caracterizando a fase entérica da doença (MARCUS et al., 2000). Outras SPI foram relatadas em *S. Typhi* e estão relacionadas com a codificação de fimbrias, resistência à bacteriocinas e produção de toxinas (PARHILL et al., 2001).

O sistema de secreção tipo III é um dispositivo molecular que permite às bactérias exportar para o interior das células hospedeiras, proteínas denominadas “efetoras”. Estas proteínas são introduzidas na célula hospedeira por meio de uma “seringa molecular”, denominada injectisoma. Uma vez no interior da célula, as proteínas efetoras interagem com domínios de proteínas do hospedeiro, por meio da fosforilação ou transferência de resíduos, que, em geral, resulta em uma cascata de reações que promovem modificações no citoesqueleto celular, que permitem a invasão celular por parte do patógeno (MOTA; SORG; CORNELIS, 2005).

2.4.1 Gene *invA*

O mecanismo pelo qual *Salmonella* spp. invade as células hospedeiras é bastante complexo, sendo que a bactéria promove sua internalização através da estimulação de células não fagocíticas. Este processo de internalização envolve o gene *invA*, que está localizado em um *operon*, presente na SPI-1 (OLIVEIRA et al., 2003).

Gálan e Curtis (1989) identificaram o primeiro *operon* de genes *invABCDEFGH*, para *Salmonella* Typhimurium considerado-o essencial para a patogênese da doença. Em 1992, Gálan et al., confirmaram que a função do gene *invA* é aumentar a capacidade de invasão de *Salmonella* Typhimurium em células

epiteliais e observaram que mutantes deste gene foram deficientes na invasão celular.

O operon do gene *invA* está presente nos sorovares de *Salmonella* e sendo reconhecido internacionalmente como padrão para identificação de *Salmonella* spp. através da técnica de PCR (AMINI et al., 2010; MALORNY et al., 2004).

2.4.2 Gene *hilA*

O gene *hilA* (*Hiper Invasibility*) está localizado em uma região altamente conservada do genoma e faz parte da SPI-1. É regulador de uma das fases mais importantes da patogênese de *Salmonella* spp., a invasão celular e apoptose dos macrófagos (BODDICKER et al., 2003). Ainda não se conhece exatamente o que promove sua ativação, no entanto, sabe-se que ele liga-se diretamente aos promotores *invF* e *prgH*, ativando o sistema de secreção tipo III e os genes que regulam a atividade da SPI-4 (KEERSMAECKER et al., 2005), os quais são necessários para a sobrevivência e multiplicação do patógeno no hospedeiro.

Por estar localizado em uma região altamente conservada do genoma bacteriano, este gene vem sendo utilizado para identificação do gênero *Salmonella*. Pathmanathan et al. (2003) e Craciunas et al. (2012) utilizaram este gene para identificação de diferentes sorovares de *Salmonella* e encontraram 100% de amplificação nos isolados analisados.

2.4.3 Gene *spvC*

Diferentes sorovares de *Salmonella* possuem plasmídios de virulência que apresentam, em geral, entre 50 e 90kb (FIERER; GUINEY, 2001), mas todos compartilham uma região altamente conservada de 8kb, formada por um operon *spv* (*Salmonella Plasmid Virulence*) que possui 5 genes (*R*, *A*, *B*, *C* e *D*) (HONG et al., 2008; PAESOLD et al., 2002). O gene *spvR* é o regulador da sua expressão, juntamente com *RPOs*, sendo que esta expressão é induzida pelo ambiente intracelular da célula hospedeira (FIERER et al., 1993; CHEN et al., 1996).

A região *spv*, tem como função principal potencializar a disseminação sistêmica do patógeno nas células do hospedeiro (Heithoff et al., 2008). Apesar

disto, este gene não parece exercer um papel fundamental no estabelecimento da infecção gastrointestinal típica provocada por *Salmonella* spp. (SWAMY et al., 1996).

Estes genes estão associados com os sorovares mais invasivos de *Salmonella* como, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum* e *S. Cholerasuis* (WOODWARD et al., 1989).

2.4.4 Gene *sefA*

As fimbrias bacterianas desempenham um papel importante na adesão de *Salmonella* spp. à superfície da célula-alvo, portanto, na patogênese. Já foram identificados pelo menos 20 *operons* distintos no genoma de *Salmonella* spp. relacionados com a produção de fimbrias (COLLIGHAN e WOODWARD, 2001; EDWARDS et al., 2002).

Dentre estes, destaca-se o operon *sef* que contém quatro genes (*sefABCD*) necessários para a translocação e formação da fímbria SEF14 (EDWARDS et al., 2000), uma das principais do gênero *Salmonella* (MURUGKAR et al., 2003). A SEF14 contém quatro subunidades protéicas: SefA, SefB, SefC e SefD, que estão distribuídas em sequência na fímbria (MURUGKAR et al., 2003).

O gene *sefA* codifica a maior subunidade da proteína SefA, que compõe a fímbria SEF14 (MIRMOMENI et al., 2008). O *sefB* codifica uma proteína da membrana externa, *sefC* codifica o maior componente da fímbria (MURUGKAR et al., 2003), e *sefD* uma adesina (EDWARDS et al., 2000).

Este gene está restrito ao sorovar *S. Enteritidis* e outros sorovares, tais como *S. Blegdam*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Rostock*, *S. Seremban* e *S. Typhi* (TURCOTTE; WOODWARD, 1993; EDWARDS et al., 2000; RANK et al., 2009).

2.4.5 Gene *pefA*

Friedrich et al. (1993) descreveram um plasmídio de 90kb, encontrado em *S. Typhimurium*, que conferiu aumento da virulência em camundongos promovendo a disseminação e infecção após invasão intestinal. Além disso, identificaram um segmento desse mesmo plasmídio, de 13,9kb, que codifica proteínas de membrana externa envolvidas na biossíntese fimbrial de bactérias entéricas. Nesta região

encontra-se o *operon pef* (*Plasmid encoded fimbriae*), que é composto por quatro genes: *A*, *B*, *C* e *D*.

Estas estruturas extracelulares, as fímbrias, auxiliam o patógeno na colonização das células intestinais através da sua ligação a regiões específicas do enterócito (CHU et al., 2006) e também contribuem para o acúmulo de fluidos intestinais que vão ocasionar a diarreia líquida característica da enterocolite (BAÜMLER et al., 1996).

2.5 Ocorrência de *Salmonella* spp. na indústria de produtos de origem animal

Salmonella spp. é o micro-organismo patogênico de maior relevância em alimentos e, a salmonelose, uma das principais doenças veiculadas por alimentos, sendo transmitida aos seres humanos através do consumo de alimentos contaminados, principalmente de origem animal como carnes, aves, ovos e leite (WHO, 2013).

A principal fonte de *Salmonella* spp. é o intestino de animais e humanos, podendo ser encontrada em matéria-prima animal (carnes e aves), ingredientes de rações animais (farinha de ossos, farinha de sangue e farinha de peixe), gema de ovo e hortaliças plantadas em ambientes contendo dejetos animais ou humanos (PARDI et al., 2001).

A ocorrência de *Salmonella* spp. em produtos cárneos brasileiros é bastante variada. Estudos realizados em diferentes regiões do país, que avaliaram carcaças de frango, encontraram uma frequência entre 6% e 50% (SANTOS et al., 2000; FUZIHARA et al., 2000; VESSONI, 2004; CARVALHO e CORTEZ, 2005; TIROLI e COSTA, 2006; RISTORI et al., 2008). Em trabalhos realizados em cortes comerciais de frango, foi encontrada uma prevalência entre 10,48% e 39,3% (COSTA, 1996; CARVALHO e CORTEZ, 2005; RIBEIRO et al., 2007), e em linguiças entre 7,5% e 24,8% (CORTEZ, 2003; CARVALHO e CORTEZ, 2005; SPRICIGO et al., 2008; MÜRMAN et al., 2009). Já em estudos que avaliaram a presença de *Salmonella* spp. em carne bovina *in natura* vendidas em estabelecimentos comerciais de diferentes regiões do Brasil, foi detectada frequências entre 3,3% e 69,5% (ALMEIDA et al., 2002; XAVIER ; JOELE, 2004; FRITZEN et al., 2006; DIAS et al., 2008). Estudos realizados no Brasil, que avaliaram carcaças bovinas em frigoríficos-

matadouros, detectaram uma prevalência de *Salmonella* spp. no couro do animal de 3,3% a 15,5%, na etapa de abate após a esfolagem de 2,5% a 3,5% e, após a lavagem pré-resfriamento, de 2% a 3% (AZEVEDO, 2009; LOPES, 2011; SILVA, 2011).

2.6 Sensibilidade a antimicrobianos

A manifestação clínica na maioria dos casos de salmonelose é moderada e auto-limitante, durando em torno de 2 a 7 dias, não sendo necessário, na maioria dos casos, antibioticoterapia. Entretanto, em indivíduos imunocomprometidos, crianças e idosos, assim como em casos mais severos ou sistêmicos, a terapia com antimicrobianos é indicada (CDC, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2012), resistência antimicrobiana é a capacidade do micro-organismo de interromper um determinado agente antimicrobiano de atuar sobre ele, resultando assim em tratamentos ineficazes, infecções persistentes e a possibilidade de transmitir essa característica a outros micro-organismos.

Cepas de *Salmonella* spp. resistentes aos antimicrobianos, particularmente aquelas resistentes à múltiplas drogas representam, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública. Desde o início dos anos 90, tem ocorrido um aumento drástico na resistência de *Salmonella enterica* aos antimicrobianos, o que tem sido atribuído a utilização indiscriminada de antimicrobianos como agentes terapêuticos ou profiláticos na medicina humana e veterinária (HUR et al., 2012; THRELFALL et al., 2000).

Dessa forma, o uso indiscriminado de antimicrobianos pode conduzir à seleção de linhagens resistentes que chegam à população através dos alimentos de origem animal (MOTA et al., 2005; CARAMINÃNA et al., 2004).

As populações bacterianas sensíveis à ação de drogas antimicrobianas podem se tornar resistentes basicamente por dois processos, mutação espontânea e seleção, em que as bactérias que transportam mutação no material genético que confere resistência sobrevivem ao uso da droga e as sensíveis são eliminadas. Assim, as células resistentes transferem essa característica às células-filhas, caracterizando a evolução ou transmissão vertical. Além disso, pode ocorrer a

aquisição de genes transportados por bactérias que são resistentes, caracterizando também uma evolução ou transferência horizontal (TENOVER, 2006).

Infecções causadas por cepas resistentes aos antimicrobianos são de tratamento difícil, pois são necessárias medidas terapêuticas alternativas, além de causarem aumento na taxa de hospitalizações, morbidade e mortalidade. Na área médica a resistência aos antimicrobianos, como à ceftriaxona e cefalosporina, que são utilizados para o tratamento de salmonelose pediátrica, e a ácido nalidíxico e ciprofloxacina, que são utilizados para o tratamento de adultos, provocam uma maior preocupação (GUERRANT et al, 2001).

Devido a emergência cada vez mais frequente de cepas multirresistentes de *Salmonella* spp., programas nacionais e internacionais de vigilância epidemiológica foram criados no intuito de estudar a epidemiologia e identificar padrões de resistência aos antimicrobianos das cepas ao longo do tempo, contribuindo assim para a identificação de fatores de risco e suas implicações em saúde pública (YAN et al., 2003).

No Brasil, no ano de 2004, a ANVISA implantou o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos (PREBAF), cuja abordagem envolve diversos aspectos na análise de risco da disseminação de resistência microbiana em *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. (BRASIL, 2008). Já nos Estados Unidos, foi criado o Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana (NARMS), cujo objetivo principal é monitorar a resistência aos antimicrobianos das bactérias entéricas isoladas de humanos, animais e alimentos. O NARMS é uma parceria entre a Food and Drug Administration (FDA), Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e U.S. Department of Agriculture (USDA), onde anualmente são elaborados relatórios com dados sobre o rastreamento e caracterização dos principais patógenos entéricos: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli*, e *Enterococcus*.

2.7 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A investigação epidemiológica, assim como o rastreamento de contaminação na cadeia de produção de alimentos e a investigação de possível relação genética entre diferentes isolados, pode ser realizada através da tipificação molecular de micro-organismos (WOO; LEE, 2006; KÉROUANTON et al., 2007; STEVENS et al., 2008; CDC, 2013).

A tipificação molecular pode ser realizada através da técnica de PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado), que é considerada uma técnica padrão ouro para esta finalidade, uma vez que os fragmentos resultantes são estáveis, de boa resolução e representam todo o genoma do micro-organismo analisado (OLIVE; BEAN, 1999). Além disso, os resultados podem ser reproduzidos entre laboratórios (PETERS et al, 2003).

A PFGE é uma variação da eletroforese em gel, desenvolvida por Schwartz e Cantor (1984) que, originalmente, foi usada para separação de cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esses pesquisadores, com base nos experimentos realizados no início dos anos 70, relataram que as moléculas de DNA que foram estiradas pela ação de um campo elétrico demandavam um maior ou menor tempo para o relaxamento, e que era proporcional ao tamanho da molécula, depois de cessada a ação do campo de força (KLOTZ; ZIMM, 1972).

O princípio da PFGE é a utilização de endonucleases de restrição que realizam o corte em regiões específicas do genoma, gerando fragmentos cromossômicos grandes e de alto peso molecular, que só podem ser analisados através da utilização de uma eletroforese em campo pulsado (MAGALHÃES et al., 2005).

Recentemente, a PFGE com a enzima de restrição *Xba*I, tem sido amplamente utilizada e reconhecida como uma técnica sensível para tipificação de diferentes sorovares de *Salmonella* se tornando padrão ouro (HARBOTTLE et al., 2006; HERRERO et al., 2006; MICHAEL et al., 2006).

Os dados gerados pela técnica de PFGE são compilados em uma rede internacional, denominada *PulseNet*, sendo compilados por diferentes laboratórios, para que possam ser analisados e comparados pelo banco de dados. Assim, o CDC

padronizou um protocolo de procedimento laboratorial, denominado protocolo *PulseNet* (CDC, 2013b).

O *PulseNet* desempenha um papel vital na vigilância e investigação de surtos de doenças transmitidas por alimentos que antes eram difíceis de detectar. Hoje, os pesquisadores podem determinar se um surto está ocorrendo, mesmo que as pessoas afetadas estejam geograficamente distantes, sendo que o foco e as suas causas podem ser identificadas em questão de horas, ao invés de dias (CDC, 2013b).

**Artigo formatado de acordo com as normas do periódico Food Control o qual
será submetido para publicação.**

Ocorrência e caracterização fenotípica e molecular de *Salmonella* spp. isoladas em frigoríficos-matadouros no sul do Rio Grande do Sul, Brasil.

Luana Tombini Decol^a, Tatiane Kuka Valente Gandra^a, Mariana Almeida Iglesias^a, Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso^b, Wladimir Padilha da Silva^a

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial; Laboratório de Microbiologia de Alimentos; Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel- Universidade Federal de Pelotas

^bDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva; Faculdade de Veterinária; Universidade Federal do Rio Grande do Sul

RESUMO

No Brasil a pecuária de corte tem grande importância na economia, tanto interna, quanto em nível de exportação. A qualidade e a segurança dos produtos cárneos são essenciais para que o Brasil permaneça como exportador competitivo no mercado internacional. Atualmente, critérios microbiológicos são usados para avaliar produtos cárneos, e *Salmonella* spp. tem sido usada como importante indicador de segurança de alimentos em diversos países. O presente estudo objetivou verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em dois frigoríficos-matadouros com diferentes níveis de inspeção (Estadual e Federal) do sul do Rio Grande do Sul e, a partir dos isolados, avaliar sua sensibilidade a antimicrobianos e realizar a caracterização genotípica, através da verificação de genes de virulência e da macrorestrição por PFGE.. Foram avaliadas 200 carcaças bovinas em quatro pontos críticos da linha de abate (após a sangria, após a esfolagem, após a evisceração e após a lavagem pré-resfriamento), totalizando 800 amostras, e 10 amostras de *mix* de lavagem das mãos dos manipuladores (antes e durante o abate), estas apenas no frigorífico com Inspeção Estadual. A ocorrência de *Salmonella* spp. nas carcaças foi de 8%, a qual foi detectada somente no ponto após a sangria, onde a coleta era realizada no couro do animal, e em uma amostra (10%) das mãos dos manipuladores durante as atividades da sala de corte. Foram obtidos 17 isolados de *Salmonella* spp., os quais foram confirmados em nível de gênero através de PCR, utilizando os genes *invA* e *hlyA*. Houve a prevalência do sorovar *S. Senftenberg* (41,17%). Os 17 isolados foram avaliados quanto a sensibilidade a 15 antimicrobianos, dos quais, 23,53% apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano (tetraciclina, sulfonamida, ampicilina, cefoxitina, cefalotina) e um apresentou resistência intermediária a estreptomicina. Com relação aos genes de virulência *sefA*, *pefA* e *spvC* observou-se que nenhum isolado carregava esses genes. O perfil de macrorestrição por PFGE, utilizando a endonuclease *Xba*I, demonstrou oito perfis genéticos distintos, sendo a maioria constituída por apenas um isolado. Esse resultado demonstra a grande diversidade genética de isolados de *Salmonella* spp. que são carregados pelo couro de bovinos e que podem entrar na planta de processamento, podendo persistir no ambiente de abate e de processamento.

Palavras-chave: *Salmonella* spp., carcaça bovina, manipulador, susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência, PFGE.

1. Introdução

Salmonella spp. é o micro-organismo patogênico de maior relevância em alimentos e, a salmonelose, uma das principais doenças veiculadas por alimentos (WHO, 2013), é transmitida aos seres humanos através do consumo de alimentos contaminados, principalmente de origem animal como carnes, aves, ovos e leite (WHO, 2013). Dessa forma, assim como em outros alimentos de origem animal, a presença de *Salmonella* spp. em carne bovina indica risco ao consumidor (Stevens et al., 2008; Gallegos-Robles et al., 2009). Embora a cocção da carne possa eliminar este micro-organismo, a ingestão da carne bovina contaminada mal cozida, assim como a contaminação cruzada por manipuladores e/ou ambiente podem causar uma salmonelose (Wagner, 2010).

Além dos prejuízos à saúde, a presença de *Salmonella* spp. pode causar uma série de problemas para a indústria de processamento de alimentos, em especial para a indústria de produtos de origem animal, como da carne bovina (Saba, 2006). A contaminação da carne bovina pode ocorrer por falhas durante várias etapas, desde o pré-abate (manejo e transporte), abate, processamento e, até a chegada ao consumidor (Li; Mustapha, 2005).

O Brasil, possuindo o segundo maior rebanho bovino efetivo do mundo, com cerca de 200 milhões de cabeças, é líder nas exportações com um quinto da carne bovina comercializada internacionalmente (MAPA, 2013). Dessa forma, deve estabelecer medidas de controle sanitário cada vez mais rígidas, para reduzir prejuízos devido às perdas indiretas, através de embargos econômicos impostos pelos países importadores e garantir a competitividade nas exportações.

Desta maneira, objetivou-se verificar a ocorrência de *Salmonella* spp. em dois frigoríficos-matadouros com diferentes níveis de inspeção (Estadual e Federal)

do sul do Rio Grande do Sul e, a partir dos isolados, avaliar sua sensibilidade a antimicrobianos e realizar a caracterização genotípica, através da verificação de genes de virulência e da macrorestrição por PFGE.

2. Material e métodos

2.1 Isolamento

Foram coletadas amostras de 200 carcaças bovinas em quatro pontos da linha de abate (1º Ponto – após sangria; 2º Ponto – após a esfolia; 3º Ponto – após a evisceração e; 4º Ponto – após a lavagem pré-resfriamento), em dois frigoríficos-matadouros, totalizando 800 amostras. Destas, 452 foram coletadas no Frigorífico A (com inspeção sanitária estadual) e 348 no Frigorífico B (com inspeção sanitária federal). Também foram coletadas 10 amostras das mãos de manipuladores na sala de cortes cárneos do Frigorífico A (5 amostras antes e 5 amostras durante as operações de corte). As amostras foram coletadas no período de abril de 2010 a março de 2012 (Anexo 1).

A amostragem das carcaças foi realizada de acordo com as recomendações vigentes na Comunidade Européia - *Commission Regulation* – CE (2007), utilizando-se a técnica de esfregaço em superfície (couro – 1º Ponto de Coleta, e carcaças – 2º, 3º e 4º Pontos de Coleta). Cada carcaça foi amostrada com um conjunto de quatro Esponjas 3M™, previamente umedecidas, cada esponja foi aplicada em uma área de 100 cm², totalizando 400 cm², segundo Andrews e Hammack (1998). O esfregaço foi realizado na região do peito do animal, nas respectivas carcaças (1º e 2º Pontos de Coleta) e meias-carcaças (3º e 4º Pontos de Coleta), conforme representado na Figura 1.



Figura 1. Esquema representativo indicando os pontos (*) onde se realizou o esfregaço em superfície na carcaça inteira e após a divisão da meia-carcaça

Fonte: Silva, 2010.

Após, cada conjunto de esponjas foi adicionado 200 mL de APS (Água Peptonada 0,1 % (Oxoid®) Salina 0,85 % (Synth®).

As mãos dos manipuladores foram amostradas através da técnica de lavagem superficial com 200 mL de APS em sacos estéreis, de acordo com Silva (2010).

Uma alíquota de 40 mL de cada amostra das superfícies das carcaças e das mãos de manipuladores foi transferida para tubos tipo *Falcon*, que foram centrifugados a uma velocidade de 1000 xg por 15 min a 5 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e *pellets* foram ressuspensos em 10 mL de Água Peptonada Tamponada – APT (Oxoid®) e homogeneizadas em vórtex, seguido de incubação a 37 °C por 18 h para um pré-enriquecimento.

2.3 Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. nas amostras foi realizada seguindo a metodologia descrita na *International Organization for Standardization* (ISO 6579:2002) (2002), com modificações. Realizou-se um enriquecimento seletivo com Caldo Tetrionato Muller-Kauffmann com novobiocina (Oxoid®) e Caldo Rappaport-Vassiliadis com soja (Oxoid®). Os tubos foram incubados por 24 h a 37 °C e 41,5 °C, respectivamente. Após, foram utilizados dois meios seletivos diferenciais: ágar Xilose Lisina Desoxicolato (Oxoid®) e ágar Manitol Lisina Cristal Violeta Verde Brilhante (Oxoid®), os quais foram incubados a 37 °C por 24 h. As colônias que apresentaram características típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas à confirmação bioquímica utilizando o ágar Tríplice Açúcar Ferro (Acumedia®) inclinado, ágar Lisina Ferro (Acumedia®) inclinado e caldo Uréia (Synth®) com incubação à 37 °C por 24 h.

Os isolados que apresentaram reações bioquímicas características para *Salmonella* spp. foram submetidos à sorologia com o Soro Polivalente Anti-*Salmonella* Somático (Probac®) e com o Soro Polivalente Anti-*Salmonella* Flagelar (Probac®) (Brasil, 2003). Em todas as análises foi utilizada, como controle positivo, a cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

2.4 Sorotipificação

A sorotipificação dos isolados de *Salmonella* spp. foi realizada no Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

2.5 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A análise de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de difusão em ágar, de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). Foram testados 15 antimicrobianos: ampicilina 10 µg (AP) (Laborclin®), cefoxitina 30 µg (CFX) (Laborclin®), cefalotina 30 µg (CFA) (Laborclin®), cefotaxima 30 µg (CFM) (Laborclin®), imipenem 10 µg (IMI) (Laborclin®), cloranfenicol 30 µg (CLO) (Laborclin®), amicacina 30 µg (AMI) (Laborclin®), gentamicina 10 µg (GEN) (Laborclin®), canamicina 30 µg (CAN) (Oxoid®), estreptomicina 10 µg (EST) (Laborclin®), ácido nalidíxico 30 µg (ACN) (Laborclin®), ciprofloxacina 5 µg (CIP) (Laborclin®), tetraciclina 30 µg (TET) (Laborclin®), trimetoprim-sulfametoxazol 25 µg (TPS) (Sensifar®) e sulfonamida 300 µg (SLF) (Laborclin®).

Em todas as análises foi utilizado, como controle, *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.7 Reação em cadeia polimerase (PCR)

A extração do DNA bacteriano foi realizada de acordo com protocolo adaptado de Sambrook e Russell (2001). Para a PCR foram utilizadas as sequências de oligonucleotídeos iniciadores apresentados na Tabela 1.

Tabela 1

Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na pesquisa de genes nos isolados de *Salmonella* spp.

Genes	Seqüência (5'-3')	pb*	Referência
<i>hilA-1</i>	GCG AGA TTG TGA GTA AAA ACA CC	413	Craciunas et al., 2012
<i>hilA-2</i>	CTG CCC GGA GAT ATA ATA ATC G		
<i>invA-1</i>	TTG TTA CGG CTA TTT TGA CCA	521	Swamy et al., 1996
<i>invA-2</i>	CTG ACT GCT ACC TTG CTG ATG		
<i>sefA-1</i>	GCA GCG GTT ACT ATT GCA GC	330	Woodward e Kirwan, 1996
<i>sefA-2</i>	TGT GAC AGG GAC ATT TAG CG		
<i>spvC-1</i>	CGG AAA TAC CAT CTA CAA ATA	669	Swamy et al., 1996
<i>spvC-2</i>	CCC AAA CCC ATA CTT ACT CTG		
<i>pefA-1</i>	TTC CAT TAT TGC ACT GGG TG	497	Haneda et al., 2001
<i>pefA-2</i>	AAG CCA CTG CGA AAG ATG CC		

*pb: número de pares de bases do gene analisado.

A PCR foi realizada utilizando-se Go Taq® Green Master Mix (Promega®), de acordo com instruções do fabricante, contendo um volume final da reação de 25 µL de solução. Foram adicionados aos microtubos 12,5 µL de Go Taq® Green Master Mix (2X), 2 µL da suspensão com o DNA, 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador *forward* e *reverse* (10 µM) e 8,5 µL de água ultra pura. Os microtubos contendo a solução foram levados ao termociclador (Bioer®) para a amplificação, empregando-se os seguintes programas: para o gene *hilA* foi utilizado 94 °C por 2 min (desnaturação), seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg (alongamento), 63 °C por 45 seg (extensão) e 72 °C por 1 min, com um alongamento final a 72°C por 7 min. Já para os genes *pefA*, *invA*, *sefA* e *spvC* foram utilizados 94 °C por 2 min,

seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 seg, 53 °C por 45 seg e 72 °C por 1 min e alongamento final a 72 °C por 7 min.

Foi utilizado como marcador de peso molecular DNA Ladder 100pb (Invitrogen). Utilizou-se, como controle positivo para os genes *hilA*, *pefA*, *invA* e *spvC*, a cepa *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Para o gene *sefA*, foi utilizado como controle positivo, a cepa *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. Como controle negativo foi utilizada a cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Os produtos gerados na PCR foram submetidos à eletroforese, em gel de agarose a 1,5 %. A visualização do produto amplificado foi realizada por solução de coloração com Brometo de Etídio (10 mg.mL^{-1}) por 20 min e observado em fotodocumentador acoplado a um computador.

2.7 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Para o estudo da relação clonal entre os isolados analisados foi utilizada a técnica de PFGE, que foi realizada de acordo com o protocolo preconizado pelo PulseNet (Ribot et al., 2006), com adaptações.

Os isolados de *Salmonella* spp. foram cultivados em placas de ágar Soja Triptose – TSA (Oxoid®) para obter crescimento confluyente após 24 h de incubação a 37 °C. Uma porção deste crescimento foi transferido para 2 mL de tampão de suspensão de células - TSC (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8.0) e, após ajuste da suspensão a uma concentração celular de aproximadamente $7 (21 \times 10^8 \text{ UFC. mL}^{-1})$ na Escala de MacFarland, uma alíquota de 300 µL desta suspensão foi transferida para um tubo de reação contendo 300 µL de agarose para PFGE a 1% em tampão TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) e 15 µL de proteinase K. Após

homogeneização, o volume total foi distribuído nos moldes para formação dos blocos de agarose.

Após a solidificação, os blocos de agarose contendo o DNA cromossomal foram transferidos para tubos contendo 4 mL de solução de lise celular (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8.0, 1% sarcosyl) e proteinase K (0,1 mg/mL) e incubados a 55°C por 1,5 h, sob agitação (175rpm). Em seguida, os blocos de agarose foram lavados por três vezes com água bidestilada pré-aquecida a 55 °C; e outras três vezes com tampão TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0), também pré-aquecido a 50°C. As etapas de lavagem foram de 10 minutos cada e realizadas a 55°C, sob agitação de 175 rpm. Uma fatia de 2 mm de cada bloco de agarose foi submetida à restrição pela enzima *Xba*I (Promega®) com uma concentração de 25 U.µL⁻¹ a 37°C, por 18 h.

Os produtos da digestão pela endonuclease foram aplicados em gel de agarose para PFGE 1% em tampão 0,5 x TBE (54 g Tris, 27,5 g ácido bórico e 20 mL EDTA, pH 8.0). A corrida eletroforética foi realizada em sistema de eletroforese do tipo CHEF- DR III (Bio-Rad®). A eletroforese ocorreu por um período de 20 h a 6.0 V, com pulso inicial de 2 seg e final de 63,8 seg em tampão de corrida TBE 0,5 x. Foi utilizada *Salmonella* Braenderup H9812 como marcador de peso molecular.

Os perfis eletroforéticos (pulsotipos) gerados por PFGE foram analisados utilizando-se o software GelCompar II (Applied Maths, Fairport) e a similaridade entre esses perfis foi avaliada com base no coeficiente de similaridade Dice (Hunter & Gaston 1988).

3 Resultados

3.1 Isolamento

Observou-se que das 200 carcaças avaliadas, 16 (8%) apresentaram *Salmonella* spp., sendo todos os isolados provenientes do Ponto 1 (após a sangria). Embora se tenha avaliado 4 pontos (após sangria, após a esfolagem, após a evisceração e após a lavagem pré-resfriamento), nos demais pontos não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. Já em relação as 10 amostras das mãos dos manipuladores da sala de corte, uma (10%) amostra apresentou *Salmonella* spp., conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2

Identificação, origem e sorovares dos isolados de *Salmonella* spp. provenientes de carcaças bovinas e mão de manipuladores em frigoríficos-matadouros da região sul do Rio Grande do Sul.

Amostra	Frig. *	Coleta	Ponto de coleta/ Carcaça	Origem	Propriedade **	Sorovar
287	A	7 ^a	Sala de corte	Manipulador	-	S. Diarizonae
307	B	8 ^a	1/43	Carcaça bovina	II	S. Derby
338	A	9 ^a	1/53	Carcaça bovina	III	S. Enterica (O:6,7)
340	A	9 ^a	1/53	Carcaça bovina	III	S. Livingstone
359	A	9 ^a	1/58	Carcaça bovina	III	S. Ohio
360	A	9 ^a	1/58	Carcaça bovina	III	S. Enterica (O:6,7)
560	A	14 ^a	1/151	Carcaça bovina	IV	S. Senftenberg
566	A	14 ^a	1/152	Carcaça bovina	IV	S. Senftenberg
572	A	14 ^a	1/154	Carcaça bovina	IV	S. Senftenberg
575	A	14 ^a	1/157	Carcaça bovina	IV	S. Senftenberg
577	A	14 ^a	1/159	Carcaça bovina	IV	S. Senftenberg
582	A	14 ^a	1/162	Carcaça bovina	IV	S. Senftenberg
612	B	19 ^a	1/176	Carcaça bovina	V	S. Senftenberg
618	B	19 ^a	1/179	Carcaça bovina	V	S. Muenster
639	B	19 ^a	1/177	Carcaça bovina	V	S. Anatum
644	B	19 ^a	1/181	Carcaça bovina	V	S. Muenster
654	B	19 ^a	1/186	Carcaça bovina	V	S. Anatum

*Frigorífico: A (Inspeção Estadual), B (Inspeção Federal).; **Propriedade: origem dos animais; Ponto 1: após a sangria

Em relação aos sorovares obtidos verificou-se prevalência de *S. Senftenberg* (41,17%), seguida de *S. Muenster* (11,77%), *S. Anatum* (11,77%), *S. Enterica* (O:6,7) (11,77%), *S. Ohio* (5,88%), *S. Derby* (5,88%), *S. Livingstone* (5,88%) e *S. Diarizonae* (5,88%) (Tabela 1).

3.2 Sensibilidade aos antimicrobianos

Todos os isolados de *Salmonella* spp. foram sensíveis aos antimicrobianos cefotaxima, imipenem, cloranfenicol, amicacina, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, trimetropim-sulfametoxazol e canamicina (Tabela 3).

Dos 17 isolados, 23,53% apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano, sendo que *S. Derby* apresentou resistência aos antimicrobianos tetraciclina e sulfonamida, enquanto um isolado de *S. Enterica* (O:6,7) e todos os isolados de *S. Anatum* apresentaram resistência à ampicilina, cefoxitina, cefalotina. Apenas um isolado de *S. Anatum* apresentou resistência intermediária a estreptomicina (Tabela 3).

3.3 Presença dos genes *hila*, *invA*, *sefA*, *pefA* e *spvC*

Os fragmentos esperados dos genes *hila* e *invA*, utilizados para confirmação em nível de gênero, foram amplificados em 100% dos isolados, conforme demonstrado nas Figuras 2 e 3. Já os genes *spvC*, *sefA* e *pefA* não foram amplificados nos isolados analisados de acordo com as Figuras 4, 5 e 6.

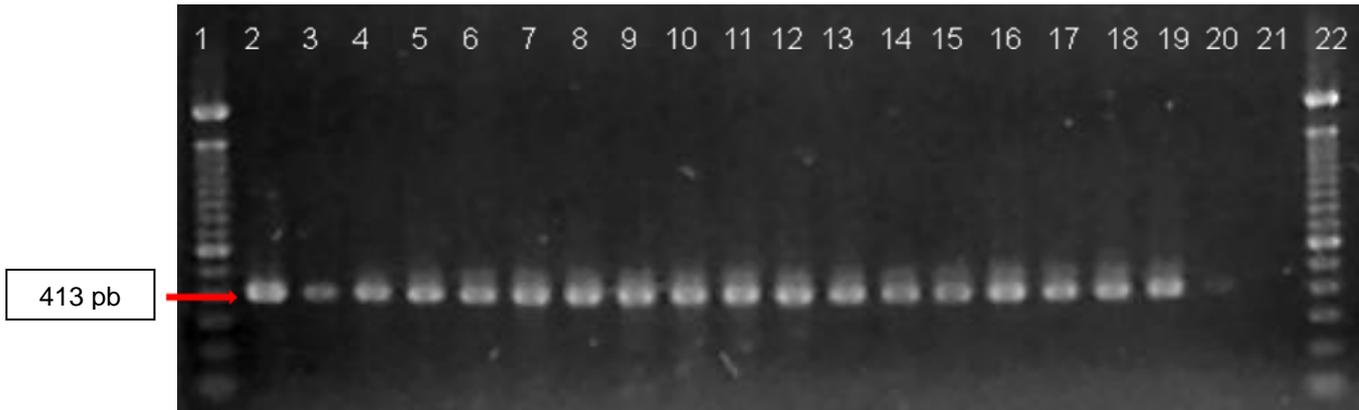


Figura 2. Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene *hilA* (413pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 *S. Typhimurium* ATCC 14028, controle positivo; canaleta 3: *S. Diarizonae*; canaleta 4: *S. Derby*; canaletas 5 e 8: *S. Enterica* (O:6,7); canaleta 6: *S. Livingstone*; canaleta 7: *S. Ohio*; canaletas de 9 a 15: *S. Senftenberg*; canaletas 16 e 18: *S. Muenster*; canaletas 17 e 19: *S. Anatum*; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: *L. monocytogenes* ATCC 7644, controle negativo.

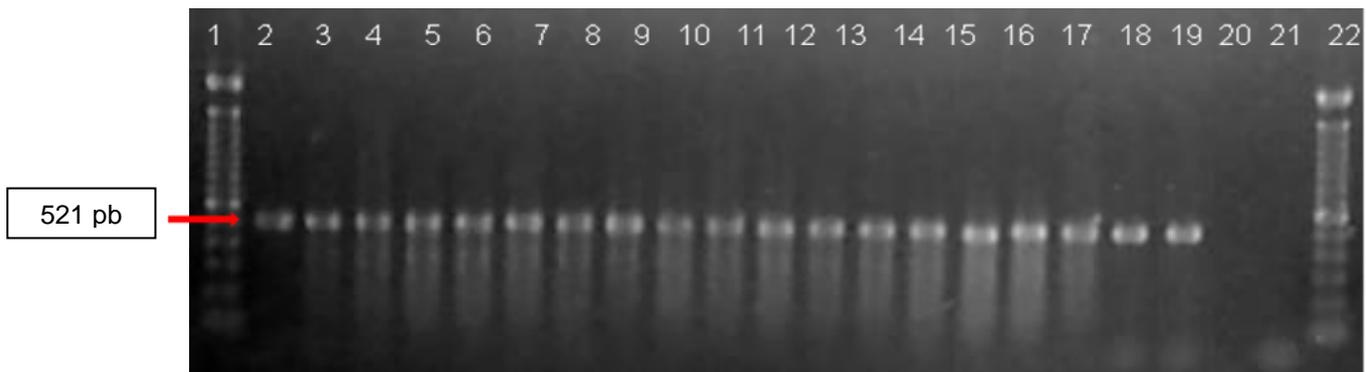


Figura 3. Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene *invA* (521 pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 *S. Typhimurium* ATCC 14028, controle positivo; canaleta 3: *S. Diarizonae*; canaleta 4: *S. Derby*; canaletas 5 e 8: *S. Enterica* (O:6,7); canaleta 6: *S. Livingstone*; canaleta 7: *S. Ohio*; canaletas de 9 a 15: *S. Senftenberg*; canaletas 16 e 18: *S. Muenster*; canaletas 17 e 19: *S. Anatum*; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: *L. monocytogenes* ATCC 7644, controle negativo.

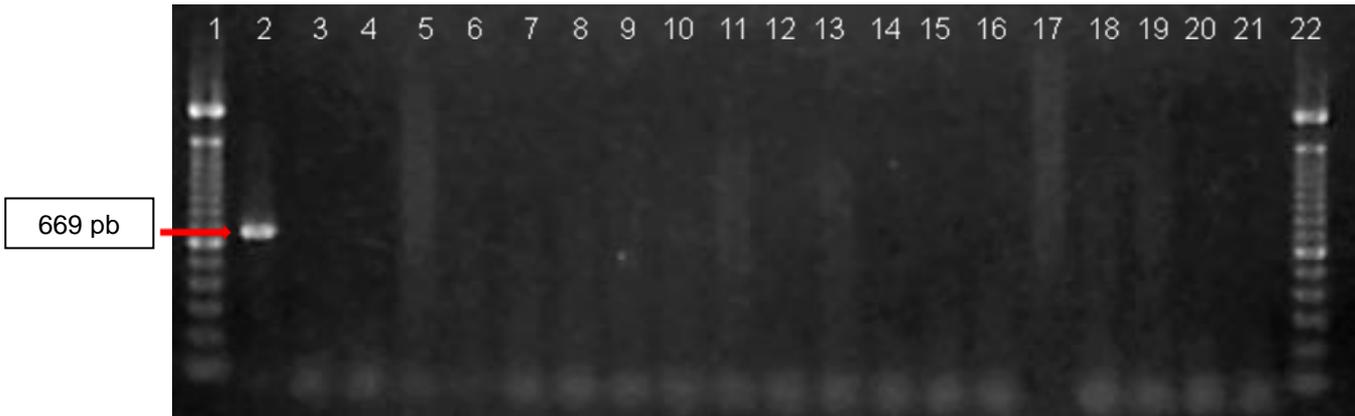


Figura 4. Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene *spvC* (669 pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 *S. Typhimurium* ATCC 14028, controle positivo; canaleta 3: *S. Diarizonae*; canaleta 4: *S. Derby*; canaletas 5 e 8: *S. Enterica* (O:6,7); canaleta 6: *S. Livingstone*; canaleta 7: *S. Ohio*; canaletas de 9 a 15: *S. Senftenberg*; canaletas 16 e 18: *S. Muenster*; canaletas 17 e 19: *S. Anatum*; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: *L. monocytogenes* ATCC 7644, controle negativo.

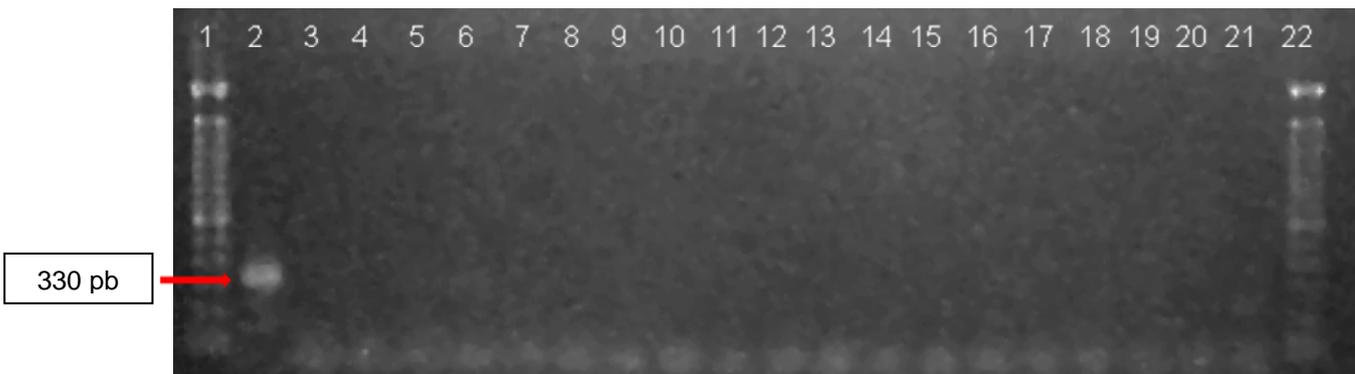


Figura 5. Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene *sefA* (330 pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 *S. Enteritidis* ATCC 13076, controle positivo; canaleta 3: *S. Diarizonae*; canaleta 4: *S. Derby*; canaletas 5 e 8: *S. Enterica* (O:6,7); canaleta 6: *S. Livingstone*; canaleta 7: *S. Ohio*; canaletas de 9 a 15: *S. Senftenberg*; canaletas 16 e 18: *S. Muenster*; canaletas 17 e 19: *S. Anatum*; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: *L. monocytogenes* ATCC 7644, controle negativo.

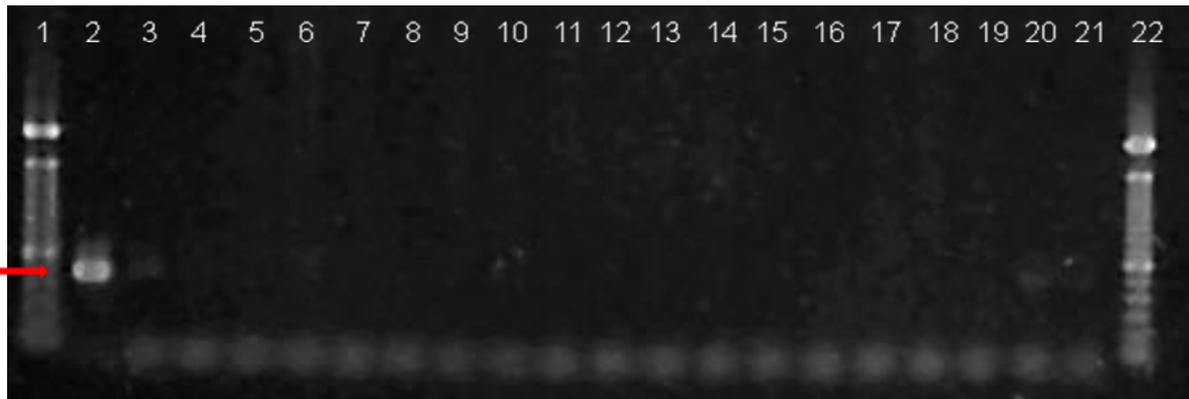


Figura 6. Imagem do gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio mostrando os produtos da amplificação do gene *pefA* (497 pb). Canaletas 1 e 22: marcador de peso molecular 100pb; canaleta 2 *S. Typhimurium* ATCC 14028, controle positivo; canaleta 3: *S. Diarizonae*; canaleta 4: *S. Derby*; canaletas 5 e 8: *S. Enterica* (O:6,7); canaleta 6: *S. Livingstone*; canaleta 7: *S. Ohio*; canaletas de 9 a 15: *S. Senftenberg*; canaletas 16 e 18: *S. Muenster*; canaletas 17 e 19: *S. Anatum*; canaleta 20: controle da reação; canaleta 21: *L. monocytogenes* ATCC 7644, controle negativo.

Tabela 3

Perfil de sensibilidade a antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. provenientes de carcaças bovinas e mão de manipuladores em frigoríficos-matadouros no sul do Rio Grande do Sul

Origem da amostra	Sorovar	Número de isolados (n:17)	Percentual de sensibilidade* (%)														
			AMP	CFX	CFL	CTX	IMP	CLO	AMI	GEN	EST	NAL	CIP	TET	TRI	SUL	CAN
Manipulador	<i>S. Diarizonae</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	<i>S. Derby</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	100	0	100
	<i>S. Enterica (O:6,7)</i>	2	50	50	50	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Carcaça bovina	<i>S. Livingstone</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	<i>S. Ohio</i>	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	<i>S. Senftenberg</i>	7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	<i>S. Muenster</i>	2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	<i>S. Anatum</i>	2	0	0	0	100	100	100	100	100	100	50**	100	100	100	100	100

*AMP: ampicilina (10 µg), CFX: ceftaxima (30 µg), CFL: cefalotina (30 µg), CTX: cefotaxima (30 µg), IMP: imipenem (10 µg), CLO: cloranfenicol (30 µg), AMI: amicacina (30 µg), GEN: gentamicina (10 µg), EST: estreptomicina (10 µg), NAL: ácido nalidíxico (30 µg), CIP: ciprofloxacina (5 µg), TET: tetraciclina (30 µg), TRI: trimetropim-sulfametoxazol (25 µg), SUL: sulfanamida (300 µg), CAN: canamicina (30 µg).

**Resistência intermediária

3.4 PFGE

Todos os isolados (17) foram submetidos a genotipagem por PFGE, entretanto, em quatro isolados ocorreu a degradação do DNA durante a análise. Dos 13 isolados analisados, obtiveram-se 8 pulsotipos, aos quais foram atribuídos letras/números de P1 a P8. O número de bandas variou entre 10 e 16, com peso molecular entre 54,7 kb e 1.135 kb, sendo P1 o pulsotipo com maior predominância, onde se agruparam 38,46% dos isolados. Quando se relacionam os pulsotipos com os frigoríficos de origem dos isolados, identificam-se três pulsotipos (P1, P2 e P3) para o frigorífico A e 5 (P4, P5, P6, P7 e P8) para o frigorífico B (Figura 7). Os pulsotipos foram agrupados em 3 grupos, de acordo com o percentual de similaridade, e identificados pelas letras A, B e C. No grupo A se encontram 61,54% dos isolados e 4 pulsotipos (P1, P2, P3 e P5); no grupo B estão 30,77% dos isolados e 3 pulsotipos distintos (P6, P7 e P8); e, no grupo C, se encontra apenas um isolado (7,69%) e o pulsotipo P4. O poder discriminatório para a PFGE utilizando a endonuclease *Xba*I foi $D=0,86$.

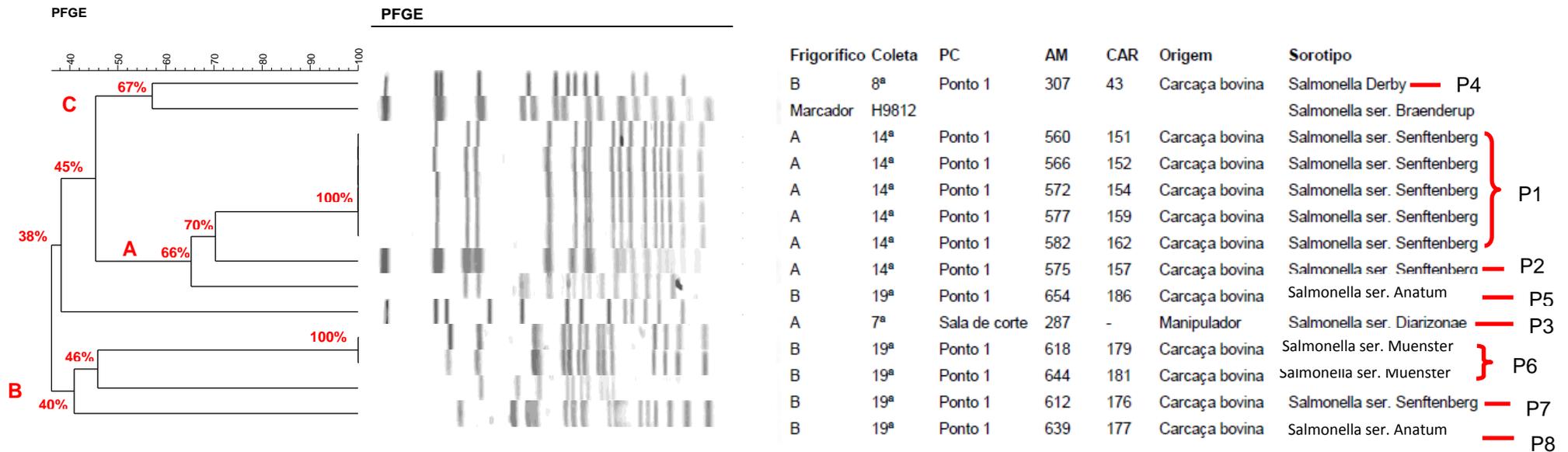


Figura 7. Dendrograma obtido através da técnica de PFGE indicando a relação genética entre 13 isolados de *Salmonella* spp. obtidos de carcaças bovinas e mão de manipuladores em dois frigoríficos-matadouros da região sul do Rio Grande do Sul. Legenda: Grupo A (P1, P2, P3, P5), Grupo B (P6, P7, P8), Grupo C (P4). PC: ponto de coleta, AM: numeração de identificação da amostra, CAR: numeração da carcaça de origem do isolado.

4. Discussão

Foram avaliados 16 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de carcaças bovinas em dois frigoríficos matadouros de bovinos da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil. A amostragem, foi realizada em quatro pontos na linha de abate: após a sangria (Ponto 1), após a esfolagem (Ponto 2), após a evisceração (Ponto 3), e após a lavagem pré-resfriamento (Ponto 4), entretanto, apenas no Ponto 1, onde a coleta foi realizada no couro do animal, houve presença de *Salmonella* spp.. Além desses, avaliou-se um isolado proveniente das mãos dos manipuladores que exerciam atividades na sala de cortes cárneos do Frigorífico com Inspeção Estadual.

A presença desse micro-organismo imediatamente após o processo de sangria demonstra que o couro do animal é um grande veículo deste patógeno para dentro da linha de abate. Apesar disso, foi possível verificar que os processos realizados durante a esfolagem, nos dois frigoríficos analisados, estão sendo eficientes para o controle da disseminação desse patógeno, tendo em vista que *Salmonella* spp. só foi detectada no Ponto 1. Apenas o frigorífico A estava com a sala de cortes cárneos em atividade, na qual foi isolada *S. Diarizonae* da mão de manipuladores. Esse resultado é preocupante por que pode ocasionar contaminação cruzada dos produtos finais, causando risco à saúde do consumidor.

Os 17 isolados de *Salmonella* spp. identificados pela metodologia convencional, foram confirmados por PCR, em nível de gênero. Para tanto, utilizaram-se regiões definidas dos genes *hilA* e *invA*, verificando-se que todos os isolados amplificaram os fragmentos esperados para ambos os genes. O gene *hilA* tem sido muito utilizado na identificação do gênero *Salmonella*. Resultados similares aos deste trabalho foram encontrados por Crăciunas et al. (2012), Marathe et al. (2012) e Pathmanathan et al. (2003) que utilizaram esta mesma região do gene para

a identificação de isolados de *Salmonella* spp. de diferentes fontes e sorovares e obtiveram amplificação em 100% das amostras, confirmando sua especificidade. Da mesma forma, o gene *invA* tem sido utilizado como padrão para identificação de *Salmonella* spp. através da técnica de PCR (Amini et al., 2010; Malorny et al., 2004). Resultados semelhantes aos deste estudo foram encontrados por Favier et al. (2013), Tafida et al. (2013), Lopes (2011) e Rowlands (2008), que utilizaram este mesmo gene na identificação de isolados de *Salmonella* spp.

A sorotipificação de salmonelas é uma técnica muito utilizada para a discriminação de isolados desse micro-organismo. *S. Senftenberg* foi o sorovar mais prevalente (41,17%), seguido de *S. Muenster*, *S. Anatum* e *S. Enterica* (cada um com 11,77%) e, os menos prevalentes foram *S. Ohio*, *S. Derby*, *S. Livingstone* e *S. Diarizonae*, cada um com 5,88%. Esta alta diversidade de sorovares presentes no couro dos animais avaliados reflete a diversidade desse micro-organismo presente nas propriedades localizadas na região sul do Rio Grande do Sul.

S. Senftenberg foi o sorovar de maior prevalência, resultado que difere de outros estudos. No Brasil, Lopes (2011) e Silva (2011) encontraram, respectivamente, *S. Infantis* e *S. Newport* como sorovares predominantes ao analisarem carcaças bovinas em três pontos da linha de abate. Já estudos realizados em outros países, como os de Stevens et al. (2008) e Ghafir et al. (2005), detectaram como sorovares prevalentes em carcaça e carne bovina, *S. Muenster* e *S. Enteritidis*, respectivamente.

Uma das características importantes que vem sendo estudada em patógenos alimentares é a resistência a diferentes antimicrobianos presentes no mercado e utilizados na terapêutica veterinária e humana (Graziani et al., 2008; Skov et al., 2007). A resistência dos isolados aos antimicrobianos testados foi baixa,

pois apenas 4 (23,53%) dos 17 isolados apresentaram resistência. Porém, os sorovares *S. Anatum*, *S. Derby* e *S. Enterica* apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano, o que tem sido descrito em diversos trabalhos realizados com *Salmonella* spp. provenientes de produtos de origem animal (Favier et al., 2013; Alemu et al., 2012; Brichta-Harhay et al., 2011; Yan et al., 2010), representando um grande problema de saúde pública. Os antimicrobianos mais relacionados a esta múltipla resistência pertencem ao grupo dos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclinas que possuem espectros de ação diferentes, mas que são usualmente utilizados em tratamentos veterinários e em humanos.

Outro aspecto de grande relevância na avaliação dos isolados é a identificação de suas características e capacidade de virulência. Para tanto, alguns genes têm sido utilizados como marcadores de virulência, dos quais, selecionaram-se os genes *sefA*, *pefA* e *spvC*. *sefA* está envolvido na expressão de fimbrias (Porwolik e McClelland, 2003); *pefA* é localizado num plasmídio codificando fimbrias que auxiliam a adesão celular (Knodler et al., 2009); e *spvC*, localiza-se em um plasmídio de virulência, sendo envolvido na infecção sistêmica (Paesold et al., 2002). Em nenhum dos isolados foi possível amplificar os genes testados, o que, possivelmente, se deve aos sorovares encontrados neste estudo. Crăciunas et al. (2012) avaliaram 39 isolados de diferentes sorovares de *Salmonella* spp., e apenas os isolados de *S. Enteritidis* amplificaram os genes *sefA* e *spvC*. Já Bolton et al. (2013), avaliaram 29 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de suínos, quanto a presença dos genes *spvC* e *pefA*, e encontraram amplificação do *spvC* em 96,56% dos isolados, todos *S. Typhimurium*, não havendo amplificação do gene *pefA* nos isolados. Tamamura et al. (2011) também utilizaram os genes *spvC* e *sefA* em 545

isolados de *S. Typhimurium* oriundos de carne bovina no Japão, encontrando a presença do gene *spvC* em 82,94% dos isolados e nenhuma amplificação para *sefA*.

A técnica de PFGE é altamente discriminatória para a subtipificação e investigação epidemiológica em patógenos alimentares (Lee et al., 2009). Dessa forma, utilizou-se essa técnica para se avaliar a relação clonal entre os isolados, com o uso da endonuclease *Xba*I, apresentaram 8 perfis distintos. Apenas dois pulsotipos (P1 e P6) agruparam mais de um isolado, sendo os demais constituídos por apenas um isolado (perfis únicos), o que demonstra uma variabilidade genética entre os isolados avaliados.

Os isolados 560, 566, 572, 577 e 582, pertencentes ao sorovar *S. Senftenberg*, que estão agrupados no pulsotipo P1, são provenientes de carcaças bovinas, do ponto 1 (couro do animal) no frigorífico A e isoladas na 14^a coleta. Estes isolados foram obtidos em carcaças distintas, entretanto, é digno de nota que os animais eram provenientes da mesma propriedade (propriedade IV), indicando que este perfil genotípico pode ser predominante naquela propriedade. Neste mesmo lote, portanto da mesma propriedade, também foi encontrado o pulsotipo P2, que é composto pelo isolado 575 (*S. Senftenberg*), demonstrando que embora um grupo clonal seja predominante naquela propriedade (P1), há diversidade de isolados de *S. Senftenberg* no ambiente e/ou animais. Os isolados 618 e 644, sorovar *S. Muenster*, foram provenientes de carcaças bovinas do frigorífico B, ponto 1 (couro do animal), da 19^a coleta, cujos animais pertenciam à propriedade V. Esses isolados apresentaram-se com o mesmo perfil genotípico (P6), porém, os demais isolados provenientes dessa mesma coleta e mesma propriedade, apresentaram-se como pulsotipos distintos e únicos. O isolado 612 (*S. Senftenberg*) formou o pulsotipo P7, enquanto os isolados 639 (*S. Anatum*) e 654 (*S. Anatum*) produziram os perfis P8 e

P5, respectivamente, demonstrando que nesta propriedade, diferentemente da propriedade IV, há maior diversidade genotípica de *Salmonella* spp. É importante ressaltar que os pulsotipos P8 e P5 são compostos por isolados do mesmo sorovar, porém, apresentam características genotípicas que as diferenciam entre si.

Foi observado, ainda, que o isolado 287, *S. Diarizonae*, proveniente da mão de um manipulador que atuava na sala de cortes do frigorífico A, obtido na 7^a coleta, apresentou um pulsotipo único (P3), não compartilhado com nenhum outro isolado proveniente do mesmo frigorífico. Salienta-se que como na mesma coleta não houve isolamento de *Salmonella* spp. nas carcaças bovinas, não há como avaliar uma possível dispersão deste isolado no frigorífico avaliado.

A diversidade genética de *Salmonella* spp. isoladas em carcaças bovinas observada neste estudo, também foi relatada por outros autores. Como exemplos, os trabalhos de Lopes (2011), no qual 44 isolados de *Salmonella* spp., provenientes de carcaças bovinas em diferentes pontos da linha de abate e de diferentes sorovares apresentaram 29 pulsotipos distintos, sendo a maioria composta por um ou dois isolados, bem como de Stevens et al. (2008), que avaliaram 78 isolados de *S. Enterica*, provenientes de abatedouros de bovinos, antes do resfriamento em câmara fria, e do comércio de Dakar, encontrando 17 perfis genotípicos diferentes.

Através da análise do dendrograma pode-se observar a existência de 3 grupos genéticos (A, B e C), sendo A o grupo predominante, agrupando 4 pulsotipos, contendo 61,54% dos isolados. O grupo B é formado por 3 pulsotipos e 30,77% dos isolados e, o grupo C, é formado pelo pulsotipo P4 que apresentou a menor relação genética entre os demais isolados.

5. Conclusões

Foram avaliados dois frigoríficos-matadouros de bovinos da região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, sendo um com Inspeção Sanitária Federal e outro com Inspeção Sanitária Estadual, verificando-se que a ocorrência de *Salmonella* spp. nas carcaças bovinas avaliadas é baixa. O couro é um veículo importante para carrear *Salmonella* spp. para o interior dos frigoríficos, entretanto, a ausência do patógeno nas etapas subsequentes do abate, demonstra que os processos realizados nos dois frigoríficos analisados, estão sendo eficientes para o controle da disseminação desse patógeno na linha de abate. O índice de resistência dos isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos testados é baixo, porém, os isolados resistentes apresentaram multirresistência. Distintos sorovares de *Salmonella* spp. foram identificados nas carcaças e o perfil de macrorestrição, realizado por PFGE, demonstra que há diversidade genética entre os isolados. Levando-se em consideração a origem das carcaças, verifica-se que há propriedades em que um determinado grupo clonal é prevalente, pois as salmonelas provenientes dos bovinos procedentes daquela propriedade rural apresentavam o mesmo pulsotipo, enquanto em outras propriedades, verificou-se uma maior diversidade genética, com 13 isolados pertencendo a 8 perfis diferentes. O isolado de *Salmonella* proveniente das mãos de manipuladores na sala de cortes cárneos do frigorífico com Inspeção Estadual apresentou sorotipo e pulsotipo diferentes dos demais, entretanto, como naquela coleta não houve isolamento do micro-organismo nas carcaças bovinas, não há como avaliar uma possível dispersão deste isolado no frigorífico avaliado.

Agradecimentos

Este estudo recebeu apoio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) através do projeto Implantação de um Centro Colaborador em Defesa Agropecuária para Avaliação de Riscos Microbiológicos em Produtos de Origem Animal, Processo nº578163/2008-0, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de Bolsa de Mestrado concedida para Luana Tombini Decol. À FIOCRUZ, pela sorotipificação dos isolados de *Salmonella* spp.

Referências

ALMEIDA, A. S.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M. *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído. **Higiene Alimentar**, v.16, n.96, p.77-81, 2002.

Andrews, W., & Hammack, T.S. (1998). Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, cap.1. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/default.htm>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2011.

Alemu, S., & Zewde, B. M. (2012). Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella enterica* serovars isolated from slaughtered cattle in Bahir Dar, Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 44, 595–600.

Amini, K., Zahraei, T. S., Gholamreza, N., Reza, R., Javid, A., & Shahrnaz, B. A. (2010). Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2202-2210.

Bolton, D. J., Ivory, C., & McDowell, D. (2013). A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: Serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *International Journal of Food Microbiology*, 160, 298–303.

Brasil. Lei Nº. 7.889, de 23 de novembro de 1989. Dispõe sobre a inspeção sanitária e industrial dos produtos de origem animal, e dá outras providências. *Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil*, Brasil, p. 21529, de 24 de novembro de 1989, seção 1.

Brasil. Instrução Normativa Nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de

Origem Animal e Água. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasil, nº181-C, p. 14-51, 18 de setembro de 2003, seção 1.

Brichta-Harhay, D. M., Terrance M. A., Bosilevac, J. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2011). Diversity of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Strains Associated with Cattle at Harvest in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 1783–1796.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2005). *Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana*. Sexta edição. CLSI documento M07-A06, 23, 2.

Commission Regulation - European Commission N° 1441/2007. (2007). Amending Regulation (EC) N° 2073/2005 On microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 18p.

Crăciunas, C., Keul, A. L., Flonta, M., & Cristea, M. (2012). DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hilA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. *Journal of Environmental Management*, 95, S15-S18.

Favier, G. I., Estrada, C. S. M. L., Otero, V. L., & Escudero, M. E. (2013). Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. *Food Control*, 29, 49-54.

Gallegos-Robles, M. A., Morales-Loredo, A., Alvarez-Ojeda, G., Osuna-García, J. A., Martínez, I. O., Morales-Ramos, L. H., et al. (2009). PCR detection and microbiological isolation of *Salmonella* spp. from fresh beef and cantaloupes. *Journal of Food Science*, 74, 37-40.

Ghafir, Y., China, B., Korsak, N., Derick, K., Collard, J. M., Godard, C., Zutter, I., & Daube, G. (2005). Belgian Surveillance Plans To Assess Changes in *Salmonella* Prevalence in Meat at Different Production Stages. *Journal of Food Protection*, 68, 11, 2269-77.

Giannella, R. A. (2006). Infectious enteritis and proctocolitis and bacterial food poisoning. In M. Feldman, L. S. Friedman, & M. H. Sleisenger (Eds.), *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease*, ed.8. Philadelphia: Saunders Elsevier.

Graziani, C., Busani, L., Dionisi, A.M., Lucarelli, C., Owczarek, S., Ricci, A., Mancin, M., Caprioli, A., & Luzzi, I. (2008). Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal source in Italy. *Veterinary Microbiology*, 128, 414-418.

Yan, H., Li L., Alam, M. J., Shinoda, S., Miyoshi, S., & Shi, L. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in retail foods in northern China. *International Journal of Food Microbiology*, 143, 230–234.

Haneda, T., Okada, N., Nakazawa, N., Kawakami, T., & Danbar, H. (2001). Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enteric* serovar Choleraesuis. *Infection and Immunity*, 69, 4, 2612 – 2620.

Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical Index on the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 11, 2465-2466.

International Organization for Standardization. ISO 6579:2002. (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4th ed.

Knodler, L. A., Winfree, S., Drecktrah, D., Ireland, R., & Steele-Mortimer, O. (2009). Ubiquitination of the bacterial inositol phosphatase, SopB, regulates its biological activity at the plasma membrane. *Cellular Microbiology*, 11, 11, 1652–1670.

Lee, H. Y., Su, L. H., Tsai, M. H., Kin, S. W., Chang, H. H., & Jung, S. L. (2009). High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 6, 2696-2699.

Li, Y., & Mustapha, A. (2005). Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in raw and ready-to-eat meat products. *Meat Science*, 71, 402-406.

Lopes, J. T. (2011) *Salmonella* spp. na cadeia de produção de carne bovina de exportação: ocorrência, perfil de suscetibilidade antimicrobiana, genes de virulência e perfil de macrorrestrição por PFGE. *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos/Universidade de São Paulo.

Malorny, B., Paccasoni, E., Fach, P., Bunge, C., Martin, A., & Helmuth, R. (2004). Diagnostic real time-PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied Environmental Microbiology*, 70, 7046-7052.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – MAPA. (2013). Bovinos e bubalinos Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/bovinos-e-bubalinos>>. Acessado em: 15 de janeiro de 2013.

Marathe, S. A., Chowdhury, R., Bhattacharya, R., Nagarajan, A. G., & Chakravorty, D. (2012). Direct detection of *Salmonella* without pre-enrichment in milk, ice-cream and fruit juice by PCR against *hilA* gene. *Food Control*, 23, 559-563.

Paesold, G., Guiney, D. G., Eckmann, L., & Kagnoff, M. F. (2002). Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol*, 4, 771-781.

Pathmanathan, S. G., Cardona-Castro, N., Sa´nchez-Jime´, M. M., Correa-Ochoa, M. M., Puthuchery, S. D., & Thong, K. L. (2003). Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hilA* gene. *Journal of Medical Microbiology*, 52, 773–776.

Peques, D. A., & Miller, S. I. (2009). *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, & R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* (7th ed). Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone.

Porwolik, S., & Mcclelland, M. (2003). Lateral gene transfer in *Salmonella*. *Microb. Infect.* 5, 977-989.

Ribot, E. M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan, B., & Barrett, T. J. (2006). Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease*, 3, 1.

Rowlands, R.E.G. (2008). Perfil de suscetibilidade antimicrodiana e genes de virulência em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares. *Dissertação de Mestrado*, 96p. Faculdade de Ciência Farmacêutica da Universidade de São Paulo - Ciência dos Alimentos.

Saba, R. Z. (2006). Influência da pressão e temperatura da água de lavagem na população microbiana da superfície de cracaças bovinas. 67f. *Dissertação* (Mestre em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Sambrook, J., & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Silva, N., Junqueira, V. C., Silveira, N. F. A., Taniwaki, M. H., Santos, R. F. S., & Gomes, R. A. R. (2010). *Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos*. 4 ed. São Paulo: Varela,. 296p.

Silva, F. F. P. (2011). Investigação de *Salmonella* spp. e micro-organismos indicadores em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouro-frigorífico. *Dissertação de Mestrado*, 58p. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos -Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Skov, M. N., Andersen, J.S., Aabo, S., Ethelberg, S., Arestrup, F.M., Sorensen, A.H., Sorensen, G., Pedersen, K., Nordentoft, S., Olsen, K.E., Gerner-Smidt, P., & Baggesen, D.L. (2007). Antimicrobial drus resistance of *Salmonella* isolates from meat and humans. Denmark. *Emerging Infection Disease*, 13, 4, 638-41.

Stevens, A., Kaboré, Y., Claude, J. D. P. G., Millemann, Y., Brisabois, A., Catteau, M., Cavin, J. F., & Dufour, B. (2006). Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *International Journal of Food Microbiology*, 110, 178–186.

Stevens, A., Kerouanton, A., Marault, M., Millemann, Y., Brisabois, A., Cavin, J. F., & Dufour, B. (2008). Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 191–197.

Swamy, S. C., Barnhart, H. M., Lee, M. D., & Dreesen D. W. (1996). Virulence Determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* Isolated from Poultry Products, Wastewater, and Human Sources. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 10, 3768–3771.

Tafida, S.Y., Kabir, J., Kwaga, J.K.P., Bello, M., Umohc, V.J., Yakubu, S.E., Nok, A.J., & Hendriksen, R. (2013). Occurrence of *Salmonella* in retail beef and related meat products in Zaria, Nigeria. *Food Control*, 32, 119-124.

Tamamura, Y., Uchida, I., Tanaka, K., Okazaki, H., Tezuka, S., Hanyu, H., Kataoka, N., Makino, S., Kishima, M., Kubota, T., Kanno, T., Hatama, S., Ishihara, R., Hata, E., Yamada, H., Nakaoka, Y., & Akiba, M. (2011). Molecular Epidemiology of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates from Cattle in Hokkaido, Japan: Evidence of Clonal Replacement and Characterization of the Disseminated Clone. *Applied and Environmental Microbiology*, 1739–1750.

Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V., Mickelsen, P. A., Murray, B.E., Persing, D. H., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33, 2233-9.

Wagner, A. B., Jr. (2010). Bacterial food poisoning. <http://generalhealthtopics.com/bacterial-food-poisoning-330.html>. Acessado em: 02 de agosto de 2010.

Woodward, M. J., & Kirwan, S. E. (1996). Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. *Vet . Record*, 138, 411-4 13.

World Health Organization (WHO). *Health topics: Salmonella*. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acessado em: 18 de fevereiro de 2013.

3 CONCLUSÕES

- A avaliação de dois frigoríficos-matadouros de bovinos sendo um com Inspeção Sanitária Federal e outro com Inspeção Sanitária Estadual, demonstra que a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas na região sul do Rio Grande do Sul, Brasil, é baixa.
- O couro do animal é um veículo importante para carrear *Salmonella* spp. para o interior dos frigoríficos, entretanto, a ausência do patógeno nas etapas subsequentes do abate, demonstra que os processos realizados nos dois frigoríficos analisados, estão sendo eficientes para o controle da disseminação desse patógeno na linha de abate.
- O índice de resistência dos isolados aos antimicrobianos testados é baixo, porém, os isolados resistentes apresentaram multirresistência.
- Não foi detectada a presença dos genes de virulência *pefA*, *sefA* e *spvC* nos isolados de *Salmonella* spp., em função dos sorovares encontrados.
- Há grande diversidade genética entre os isolados. Levando-se em consideração a origem das carcaças, verifica-se que há propriedades em que um determinado grupo clonal é prevalente, pois salmonelas provenientes dos bovinos procedentes daquela propriedade rural apresentavam o mesmo pulsotipo, enquanto em outras propriedades, verificou-se uma maior diversidade genética, com 13 isolados pertencendo a 8 perfis diferentes. A maioria dos isolados produziu um perfil genético único.
- O isolado de *Salmonella* proveniente da mão de manipulador na sala de cortes cárneos do frigorífico com Inspeção Estadual apresentou sorotipo e pulsotipo diferentes dos demais, entretanto, como naquela coleta não houve isolamento do micro-organismo nas carcaças bovinas, não há como avaliar uma possível dispersão deste isolado no frigorífico avaliado.

REFERÊNCIAS

- ALLERBERGER, F.; LIESEGANG, A.; GRIF, K., PRAGER, R.; DANZL, J.; HÖCK, F. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Dublin in Austria. **Euro Surveill**, v. 7, p.325, 2002.
- ALMEIDA, A. K.; MICHELS, I. L. O Brasil e a economia-mundo: o caso da carne bovina. **Ensaio FEE**, v. 33, n. 1, p. 207-230, 2012.
- AMINI, K.; ZAHRAEI, T. S.; GHOLAMREZA, N.; REZA, R.; JAVID, A.; SHAHRNAZ, B. A. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, p.2202-2210, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE – ABIEC. **Exportação de carne bovina em 2012 soma US\$ 5,769 bilhões, indica Abiec**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/noticia.asp?id=839#.UP Sj0x37LZ8>>. Acessado em: 25 de janeiro de 2013.
- ASSOCIAÇÃO SUL-MATOGROSSENSE DOS PRODUTORES DE NOVILHO PRECOCE – ASPNP. **A importância da carne bovina na alimentação**. Disponível em:<<http://www.novilhoms.com.br/artigos/a-importancia-da-carne-bovina-na-alimentacao>>. Acessado em: 25 de janeiro de 2013.
- BAILEY, S.; RICHARDSON, L. J.; COX, N. A.; COSBY, D. E. *Salmonella*. In: JUNEJA, V. K.; SOFOS, J. N. EDS. **Pathogens and Toxins in Foods: Challenges and Interventions**. Cap.7, p.108-118, Washington, DC: ASM Press, 2010.
- BODDICKER, J. D.; KNOSP, B. M.; JONES, B. D. Transcription of the *Salmonella* invasion gene activator, *hilA*, requires HilD activation in the absence of negative regulators. **Journal of Bacteriology**, v.185, p. 525-533, 2003.
- BOOP, C. A.; BRENNER, F. W.; WELS, J. G.; STROCKBINE, N. A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., Washington, DC: ASM Press, p.467, 1999.
- BAÜMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; BOWE, F. A.; KUSTERS, J. G.; HOFFMANN, S.; HEFFRON, F. The *pef* fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. **Infect Immun**, v.64, p.61–68, 1996.
- BRASIL. Resolução–RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos**. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, nº 7-E, p. 46-53, 10 Jan. 2001, seção I.
- CARAMINÃNA, J. J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v.104, n.1/2, p. 133-139, 2004.

CARVALHO, A. C. D. F. B. D.; CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiça e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1465-1468, 2005.

CHEN, C. Y.; ECKMANN, L.; LIBBY, S. J.; FANG, F. C.; OKAMOTO S.; KAGNOFF, M. F.; FIERER, J.; GUINEY, D. G. Expression of *Salmonella typhimurium* rpoS and rpoS-dependent genes in the intracellular environment of eukaryotic cells. **Infect. Immun**, v.64, p.4739–4743, 1996.

CHU, C.; CHIU, C. H. Evolutions of the Virulence Plasmid of nontyphoid *Salmonella* and its association with antimicrobial resistance. **Microb. Infect.**, v.8, pg.1931-1935, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CAC. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. **Codex Committee on Food Higiene. Principles and Guidelines for the Conduct of Microbiological Risk Assessment. Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme.** Rome: FAO. CAC/GL 30, 1999.

COLLIGHAN, R. J.; WOODWARD, M. J. The SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is encoded within a pathogenicity islet. **Veterinary Microbiology**, v.80, n. 3, p. 235-245, 2001.

CORTEZ, A. L. L. Indicadores de qualidade higiênico-sanitária em lingüiça fresca comercializada no município de Jaboticabal, SP. Jaboticabal, 2003, 42p. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

COSTA, F. N. Sorotipos de *Salmonella* em carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio e comportamento das cepas isoladas frente à ação de antimicrobianos. Jaboticabal, 1996, 72p. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

CRĂCIUNAS, C.; KEUL, A. L.; FLONTA, M.; CRISTEA, M. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting hilA, agfA, spvC and sef genes. **Journal of Environmental Management**. v.95, p.S15-S18, 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **Typhoid Fever.** Disponível em:<http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/typhoid_fever/>. Acessado em: 18 de fevereiro de 2013a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. **What is PulseNet?** Disponível em:< <http://www.cdc.gov/pulsenet/whatis.htm>>. Acessado em: 20 de fevereiro de 2013b.

EDWARDS, R. A.; SCHIFFERLI, D. M.; MALOY, S. R. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. **Proceedings of The National Academy of Sciences of The USA**, v.97, n.3, p.1258-1262, 2000.

DIAS, P. A.; CONCEIÇÃO, R. C. S.; COELHO F. J. O.; TEJADA, T. S.; SEGATTO, M.; TIMM, C. D. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de

embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, v.75, n.3, p.359-363, 2008.

EDWARDS, R. A.; OLSEN, G. J.; MALOY, S. R. Comparative genomics of closely related *Salmonella*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.2, p.94-99, 2002.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5ed, São Paulo: Atheneu, cap.43, p. 329-338, 2008.

FIERER, J.; ECKMANN, L.; FANG, F.; PFEIFER, C.; FINLAY, B. B.; GUINEY, D. Expression of the *Salmonella* virulence plasmid gene spvB in cultured macrophages and nonphagocytic cells. **Infect. Immun**, v.61, p.5231-5236, 1993.

FIERER, J.; GUINEY, D.G. Diverse virulence traits underlying, different clinical outcomes of *Salmonella* infection. **J. Clin. Investig.** v.107, p.775e780, 2001.

FONTAINE, R.E.; ARNON, S.; MARTIN, W.T.; VERNON, T.M.; GANGAROSA, JR, E.J.; FARMER, J.J.; MORAN, A.B.; SILLIKER, J.H.; DECKER, D.L. Raw hamburger: an interstate common source of human Salmonellosis. **American Journal of Epidemiology**, v.107, p.36-45, 1978.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. *Enterobacteriaceae*. In: FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S.; BARON, E.J. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 11ed. St. Louis: Mosby, p. 509-526, 2002.

FRANCO, B. D. M. F.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T.; CHIARINI, E.; AZEVEDO, A. P.; LOPES, G. V.; FOGO, V. S. Perigos e riscos microbiológicos em carne bovina. In: Bovinocultura de Corte. Piracicaba: **FEALQ**, v.2, cap.65, p. 1305-1320, 2010.

FRIEDRICH, M. J.; KINSEY, N. E.; VILA, J.; KADNER, R. J. Nucleotide sequence of a 13,9 kb segment of the 90 kb virulence plasmid of *Salmonella typhimurium*: the presence of fimbrial biosynthetic genes. **Molecular Microbiology**, v.8, n.3, p.543-558, 1993.

FRITZEN, A. L.; SCWERZ, D. L.; GABIATTI, E. C.; PADILHA, V.; MACARI, S. M. Análise microbiológica de carne moída de açougues pertencentes a 9º Regional de Saúde do Paraná. **Higiene Alimentar**, v.20, n.144, 2006.

FUZHARA, T. O.; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouse. **Journal of Food Protection**, v.63, n.12, p.1749-1753, 2000.

GALÁN, J. E.; CURTISS III, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of National Academy of Science from USA**, v.86, p.6383-6387, 1989.

GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella* Invasion Gene *invA*: Homology of *InvA* to Members of a New Protein Family. **Journal of Bacteriology**, pg.4338-4349, 1992.

GIANNELLA, R. A. Infectious enteritis and proctocolitis and bacterial food poisoning. In M. Feldman, L. S. Friedman, & M. H. Sleisenger (Eds.), **Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease**, ed.8. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006.

GRAZIANI, C.; BUSANI, L.; DIONISI, A.M.; LUCARELLI, C.; OWCZAREK, S.; RICCI, A.; MANCIN, M.; CAPRIOLI, A.; LUZZI, I. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from human and animal source in Italy. **Veterinary Microbiology**. v.128, p.414-418, 2008.

GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. **Cell**, v.87, n.5, p.791-794, 1996.

GUERRANT, R. L., et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.** v.32, p.331–351, 2001.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P. A.; WEILL, F. X. Supplement 2003-3007 (No.47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.161, n.1, p.26-29, 2010.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v.23, n.6 ,p.1089-1097, 1997.

HARBOTTLE, H.; WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F.; WALKER, R.D.; ZHAO, S. Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, p.2449–2457, 2006.

HEITHOFF, D.M.; SHIMP, W.R.; LAU, P.W.; BADIE, G.; ENIOUTINA, E.Y.; DAYNES, B.R.A.; BYRNE, A.; HOUSE, J.; MAHAN, M.J. Human *Salmonella* Clinical Isolates Distinct from Those of Animal origin. **Appl. Environ. Microbiol**, v.10, p.1757-1766, 2008.

HERRERO, A.; RODICIO, M.R.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Molecular epidemiology of emergent multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium strains carrying the virulence resistance plasmid pUO-StVR2. **J. Antimicrob. Chemother**, v.57, p.39–45, 2006.

HIRSH, D.C. *Salmonella*. In: BIBERSTEIN, D.V.M.; ZEE, Y.C. **Review of veterinary microbiology** . Boston: Blackwell Scientific, p.110-115, 1990.

HONG, S.F.; CHIU, H.; CHU, C.; FENG, C.; OU, T.J. Complete nucleotide sequence of a virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Dublin and its phylogenetic relationship to the virulence plasmids of serovars Choleraesuis, Enteritidis, Typhimurium. **FEMS Microbiol.**, v.282, p.39-43, 2008.

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

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. Maryland: Aspen, 6ed, 679p., 2005.

KEERSMAECKER, S. C. J.; MARCHAL, K.; VERHOEVEN, T. L. A.; ENGELEN, K.; VANDERLEYDEN, J.; DETWEILER, C. S. Microarray analysis and motif detection reveal new target of the *Salmonella enteric* serovar Typhimurium HilA regulatory protein, including HilA itself. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.13, p.4381-4391, 2005.

KÉROUANTON, A.; MARAULT, M.; LAILLER, R.; WEILL, F. X.; FEURER, C.; ESPIÉ, E.; BRISABOIS, A. Pulsed-Field Gel Electrophoresis Subtyping Database for foodborne *Salmonella enteric* Serotype Discrimination. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, p.293-303, 2007.

KLOTZ, L. C.; ZIMM, B. H. Retardation times of deoxyribonucleic acid solutions. II. Improvements in apparatus and theory. **Macromolecules**, v.5, p.471-81, 1972.

LI, Y.; MUSTAPHA, A. Application of a multiplex PCR for the simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in raw and ready-to-eat meat products. **Meat Science**, v.71, p.402-406, 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. **Instrução Normativa nº 1**, de 09 de Janeiro de 2002.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA – MAPA. **Exportação**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>>. Acessado em: 15 de janeiro de 2013.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 912p, 2000.

MAGALHÃES, V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p.155-161, 2005.

MALORNY, B.; PACCASONI, E.; FACH, P.; BUNGE, C.; MARTIN, A.; HELMUTH, R. Diagnostic real time-PCR for detection of *Salmonella* in food. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p.7046-7052, 2004.

MARCUS, S. L. et al. *Salmonella* pathogenicity island: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v.2, n.2, p.145-56, 2000.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McGAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, p.607-625, 1999.

MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from slaughter pigs. **Vet. Microbiol.** v.112, p.43–52, 2006.

MIRMOMENI, M. H.; KIANI, S.; SISAKHTNEZHAD, S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. **Pakistan Journal of Biological Sciences** , v.11, n.11, p.1497-1501, 2008.

MOTA, L. J.; SORG, I.; CORNELIS, G. R. Type III secretion: The bacteria-eukaryotic express. **FEMS Microbiology Letters**, v.252, p.1-10, 2005.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465 - 470, 2005.

MÜMANN, L.; DOS SANTOS, M. C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v.20, n.3, p.191-195, 2009.

MURUGKAR, H. V.; RAHMAN, H.; DUTTA, P. K. Distribution of virulence genes in *Salmonella* serovars isolated from man and animals. **Indian Journal of Medical Research**, v.117, p.66-70, 2003.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, n.1, p.47-51, 2004.

OLIVE, M. D.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.I.R; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, p.123-124, 2003.

PARDI, M. C.; et al. Ciência e higiene da carne. Tecnologia de sua obtenção e transformação. Universidade Federal Fluminense. **EDUFF-Editora Universitária**, 623p, 2001.

PARHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K. D.; THOMSON, N. R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K. L.; BENTLEY, S. D.; HOLDEN, M. T.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R. M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T. T.; HOLROYD, S.; JAGELS,

K.; KROGH, A.; LARSEN, T. S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B. G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enteric* serovar Typhi CT8. **Nature**, v.413, n.6858, p.848-52, 2001.

PAESOLD, G.; GUINEY, D.G.; ECKMANN, L.; KAGNOFF, M.F. Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. **Cell Microbiol.** v.4, p.771-781, 2002.

PATHMANATHAN, S. G.; CARDONA-CASTRO, N.; SA'NCHEZ-JIME' NEZ, M. M.; CORREA-OCHOA, M. M.; PUTHUCHEARY, S. D.; THONG, K. L. Simple and rapid detection of *Salmonella* strains by direct PCR amplification of the *hliA* gene. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.773–776, 2003.

PEDROSO, E. K. O processo de certificação na cadeia de carne bovina. Publicação técnica. **Associação Brasileira de Zootecnistas**, 2009.

PEQUES, D. A.; MILLER, S. I. *Salmonella* species, including *Salmonella* Typhi. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, & R. Dolin (Eds.), **Principles and Practice of Infectious Diseases** (7th ed). Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2009.

PETERS, T. M. et al. The Salm-gene project: a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. **Eurosurveillance**, v.8, n.2, p.46-50, 2003.

POPOFF, M. Y. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8.ed. **WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**. Pasteur Institute, Paris, France. 2001.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. The genus *Salmonella*. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T., eds. **Bergey's manual os systematic bacteriology**. 2^a ed. New York: Springer, v.2, p.764-799, 2005.

RANK, D. L.; SAEED, M. A.; MURIANA, P. M. Cloning of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis fimbrial protein SefA as a surface protein in *Escherichia coli* confers the ability to attach to eukaryotic cell lines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.20, p.6622-6625, 2009.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMAN, A.; SANTOS, L. R. D.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. D. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.296-299, 2007.

RISTORI, C. A.; BERGAMINI, A. M. M.; ROWLANDS, R. E. G.; LOPES, G. I. S. L.; PAULA, A. M. R.; OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO, E. G. A.; TORRE, J. C. M. D.; PRADO, S. P. T. P.; YOSHIDA, J. T. U.; RODRIGUES, R. S. M.; TAHA, O. G.; MASIIGLIA, D. A. P., JAKABI, M. Quantificação de *Salmonella* spp. e avaliação dos

dizeres de rotulagem de cracaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. **BEPA, Boletim Epidemiológico Paulista**, v.52, p.16-19, 2008.

ROÇA, R. O. SERRANO, A. M. Operações de abate de bovinos. **Higiene Alimentar**. São Paulo, v.8, n.34, p.14-20, 1994.

SABA, R. Z. **Influência da pressão e temperatura da água de lavagem na população microbiana da superfície de cracaças bovinas**. 2006. 67f. Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. M. Revisão: Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. **Brazilian Journal Food Technology**, v.12, n.4, p.266-276, 2000.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI Jr. A.; FERNANDES, S. A.; TAVACHIO, A. T.; AMARAM, L. A. D. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.1, p.39-42, 2000.

SAROJ, S. D. et al. Distribution of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-8 and SPI-10 among different serotypes of *Salmonella*. **Journal of Medical Microbiology**, v.57, p.424-427, 2008.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, R. C. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, p.67-75, 1984.

SCHWARTZ, K.J. **Salmonellosis**. In: STRAW, B.E. et al. Diseases of swine . 8.ed. Ames, Iowa: Iowa State University, Cap.39, p.535-551, 2000.

SHELOBOLINA, E. S.; SULIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D. R. Isolation characterization and U (VI)-reducing potencial of a facultatively anaerobic, acide-resistant bacterium from low-pH, nitrate and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, n.5, pg.2950-2965, 2004.

SKOV, M. N.; ANDERSEN, J.S.; AABO, S.; ETHELBERG, S.; AARESTRUP, F.M.; SORENSEN, A.H.; SORENSEN, G.; PEDERSEN, K.; NORDENTOFT, S.; OLSEN, K.E.; GERNER-SMIDT, P.; BAGGESEN, D.L. Antimicrobial drus resistance of *Salmonella* isolates from meat and humans. Denmark. **Emerging Infection Disease**, v.13, n.4, p.638-41, 2007.

SOFOS, J. N.; Challeges to meat safety in the 21th century. **Meat Science**, v.78, p.3-13, 2008.

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

STEVENS, A.; KEROUANTON, A.; MARAULT, M.; MILLEMANN, Y.; BRISABOIS, A.; CAVIN, J. F.; DUFOUR, B. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. **International Journal of Food Microbiology**, v.123, pg.191–197, 2008.

SWAMY, S.C.; BARNHART, H.M.; LEE, M.D.; DREESEN, D.W. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from poultry products, wastewater and human sources. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.10, p.3768-3771, 1996.

SWANENBURG, M., VAN DER WOLF, P. J.; URLINGS, H. A.; SNIJDERS, J. M.; VAN KNAPEN, F. *Salmonella* in slaughter pigs: The effect of logistic slaughter procedures of pigs on the prevalence of *Salmonella* in pork. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.3, p.231–242, 2001.

TARWATE, B.G.; SHERIKAR, A.T.; MURUGKAR, H.V. Microbiological analysis of environmental sources of contamination in deonar abbatoir. **Journal Food Sci. Technol.**, v.30, n.2, p.127-129, 1993.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C.; PERESI, J. T.; FUZIHARA, T. O.; YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhumam sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v.65, n.6, p.1041-1044, 2002.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, Nova Yorque, v. 119, p. 3 - 10, 2006.

THRELFALL, E. J.; WARD, L. R.; FROST, J. A. et al. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. **International Journal of Food Microbiology** , v. 62, n. 1-2, p. 1-5, 2000.

TIROLI, I. C. C.; COSTA, C. A. D. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados de cidade de Manaus-AM. **Acta Amazonica**, v.36, p.205-208, 2006.

TURCOTTE, C.; WOODWAR, M. J. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of gene encoding the SEF14 finbrial antigen of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of General Microbiology**, v. 139, p.1477-1485, 1993.

VESSONI, C. L. Z. Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. isoladas de carcaças de frango. Campinas, 2004, 100p. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**. São Paulo, v.33, n.4, p.406-414, 2009.

ZEN, S. – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **A cadeia de carne bovina no Brasil.** Disponível em:<<http://www.embrapa.br/imprensa/artigos>>. Acesso em: 15 de janeiro de 2013.

WOO, Y. K.; LEE, S. H. Genetic diversity of multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from animals and humans. **Journal Microbiology**, v.44, p.106-112, 2006.

WOODWARD, M. J.; MCLAREN, I.; WRAY, C. Distribution of virulence plasmids within *Salmonellae*. **J. Gen. Microbiol.**, v.135, p.503-511, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Health topics: Typhoid fever.** Disponível em: <http://www.who.int/topics/typhoid_fever/en/>. Acessado em: 18 de fevereiro de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **10 Facts on Antimicrobial resistance.** Disponível em: http://www.who.int/features/factfiles/antimicrobial_resistance/facts/en/index.html. Acesso em: 18 de fevereiro de 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Health topics: Salmonella.** Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acessado em: 18 de fevereiro de 2013.

XAVIER, V. G.; JOELE, M. R. S. P. Avaliação das condições higiênico-sanitárias da carne bovina in natura comercializada na cidade de Belém, PA. **Revista Higiene Alimentar** , v.18, n.125, p.64-73, 2004.

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

ANEXOS

ANEXO 1

Informações dos animais nas coletas com presença de *Salmonella* spp.

Coleta	Data	Frigorífico	Animal*	Sexo	Tipo de criação**	Procedência (município)
7 ^a	12/10/2010	A	39	M	Criação extensiva	Arroio Grande
			40	M	Criação extensiva	Arroio Grande
			41	M	Criação extensiva	Arroio Grande
			42	M	Criação extensiva	Arroio Grande
8 ^a	24/11/2010	B	43	M	Criação extensiva	Santa Maria
			44	M	Criação extensiva	Santa Maria
			45	M	Criação extensiva	Santa Maria
			46	M	Criação extensiva	Santa Vitória
			47	M	Criação extensiva	Santa Vitória
			48	M	Criação extensiva	Santa Vitória
			49	M	Criação extensiva	Santa Vitória
			50	M	Criação extensiva	Santa Vitória
			51	M	Criação extensiva	Santa Vitória
			52	M	Criação extensiva	Santa Vitória
9 ^a	11/01/2011	A	53	F	Criação extensiva	Santa Vitória
			54	F	Criação extensiva	Santa Vitória

			55	F	Criação extensiva	Santa Vitória
			56	F	Criação extensiva	Santa Vitória
			57	F	Criação extensiva	Santa Vitória
			58	F	Criação extensiva	Santa Vitória
			59	F	Criação extensiva	Santa Vitória
			60	F	Criação extensiva	Santa Vitória
14 ^a	16/08/2011	A	111	F	Criação extensiva	Piratini
			112	F	Criação extensiva	Piratini
			113	F	Criação extensiva	Piratini
			114	F	Criação extensiva	Piratini
			115	F	Criação extensiva	Piratini
			116	F	Criação extensiva	Piratini
			117	F	Criação extensiva	Piratini
19 ^a	27/03/2012	B	176	M	Criação extensiva	Bagé
			177	M	Criação extensiva	Bagé
			178	M	Criação extensiva	Bagé
			179	M	Criação extensiva	Bagé
			180	M	Criação extensiva	Bagé
			181	M	Criação	Bagé

					extensiva	
			182	M	Criação extensiva	Bagé
			183	M	Criação extensiva	Bagé
			184	M	Criação extensiva	Bagé
			185	M	Criação extensiva	Bagé
			186	M	Criação extensiva	Bagé
			187	M	Criação extensiva	Bagé

* Identificação do animal para análise no laboratório (sequência: 001 – 200).

** Animais criados por confinamento ou criação extensiva