



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

LARISSA RIBEIRO GONÇALVES

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS *SALMONELLA ENTERICA*
ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO
FEDERAL

BRASÍLIA, DF

2019

LARISSA RIBEIRO GONÇALVES

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS *SALMONELLA ENTERICA*
ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO
FEDERAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.



Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

GG643r Gonçalves, Larissa Ribeiro
Resistência antimicrobiana de bactérias Salmonella
enterica isoladas de carnes de frango comercializadas no
Distrito Federal / Larissa Ribeiro Gonçalves; orientador
Daniela Castilho Orsi; co-orientador Izabel Cristina
Rodrigues Silva. -- Brasília, 2019.
45 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Salmonella enterica. 2. Resistência antimicrobiana.
3. Carnes de frango. I. Orsi, Daniela Castilho , orient.
II. Silva, Izabel Cristina Rodrigues, co-orient. III. Título

LARISSA RIBEIRO GONÇALVES

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS *SALMONELLA ENTERICA*
ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO
FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva
(FCE/ Universidade de Brasília)

Mestranda Erika da Silva Monteiro
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

RESUMO

As salmonelas são bacilos gram-negativos, tem como principal habitat o trato intestinal de humanos e animais, sendo a espécie *Salmonella enterica* o principal agente envolvido em surtos de origem alimentar no Brasil. O objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa de *Salmonella enterica* em carnes de frango comercializadas em supermercados do Distrito Federal e avaliar a resistência antimicrobiana das bactérias isoladas. Foram coletadas onze amostras de carne de frango resfriadas de diferentes cortes (peito, coxa, sobrecoxa e coxinha da assa) e de diferentes supermercados. Realizaram-se testes bioquímicos para triagem de *Salmonella* spp. e os isolados suspeitos foram identificados através da técnica de PCR. A susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer). O presente estudo mostrou alta prevalência de *Salmonella enterica* nas carnes de frango. Das 25 cepas testadas, os antibióticos aos quais as cepas apresentaram maior resistência foram: amoxicilina, sulfonamida e tetraciclina. Dez cepas (40%) foram classificadas como multirresistentes, isto é, cepas resistentes a três antibióticos ou mais. A utilização indiscriminada de antibióticos na avicultura causa uma pressão seletiva, levando a indução de cepas resistentes e multirresistentes com a possibilidade de transmissão tanto para outras aves quanto para homens saudáveis, gerando prejuízos financeiros a avicultura e à saúde pública. Assim é importante que se tenha medidas mais rigorosas de fiscalização para um maior controle de contaminação da carne de frango por *Salmonella* spp.

Palavras-chave: *Salmonella enterica*, resistência antimicrobiana, carnes de frango.

ABSTRACT

Salmonella are gram-negative bacilli; whose main habitat is the intestinal tract of humans and animals. The *Salmonella enterica* species is the main agent involved in food-borne outbreaks in Brazil. The aim of this study was to perform *Salmonella enterica* research on chicken meat commercialized in supermarkets in the Federal District and to evaluate the antimicrobial resistance of the isolated bacteria. Eleven samples of cooled chicken meat from different cuts (chest, thigh, over thigh and wing thigh) and from different supermarkets were collected. Biochemical tests were performed for screening *Salmonella* spp. and the suspected isolates were identified by the PCR technique. The susceptibility of the strains to the antimicrobials was evaluated by the disc-diffusion technique (Kirby-Bauer method). The present study showed a high prevalence of *Salmonella enterica* in chicken meat. Of the 25 strains tested, the antibiotics to which the strains showed the highest resistance were: amoxicillin, sulfonamide and tetracycline. Ten strains (40%) were classified as multiresistant, ie strains resistant to three or more antibiotics. The indiscriminate use of antibiotics in poultry farming causes selective pressure, leading to the induction of resistant and multiresistant strains with the possibility of transmission to both chickens and healthy humans, causing financial losses to poultry and public health. So, it is important to have stricter enforcement measures for greater control of contamination of chicken meat with *Salmonella* spp.

Keywords: *Salmonella enterica*, antimicrobial resistance, chicken meats

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Características do gênero <i>Salmonella spp</i>	10
1.2. <i>Salmonella</i> em alimentos.....	11
1.3. <i>Salmonella</i> na cadeia produtiva do frango de corte.....	13
1.4. Legislação brasileira em relação ao controle de <i>Salmonella</i> na cadeia produtiva do frango de corte	14
1.5. <i>Salmonella spp.</i> e resistência aos antimicrobianos	17
2. JUSTIFICATIVA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1. Objetivo geral	22
3.2. Objetivos específicos.....	22
4. ARTIGO.....	23
MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas	26
Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas.....	27
Identificação molecular de bactérias suspeitas de serem patogênicas	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO	34
5. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência do primer e tamanho do produto amplificado na PCR para identificação do gene <i>invA</i>	28
Tabela 2. Prevalência de bactérias <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de carne de frango.....	29
Tabela 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de carne de frango.....	30
Tabela 4. Número de cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de carne de frango com resistência aos antimicrobianos testados.....	31
Tabela 5. Perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de <i>Salmonella entérica</i> isoladas de carne de frango.....	32

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Antibiograma das bactérias <i>Salmonella enterica</i> isoladas das amostras de carnes de frango.....	42
ANEXO 2. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA HIGIENE ALIMENTAR.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

SVE – Serviço Veterinário Estadual

SIF – Serviço de Inspeção Federal

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

FA – Fenilalanina

LIA – Lisina Iron Agar

SS – Salmonella Shigella

TSI – Três Açúcares e Ferro

XLD – Ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

SUASA – Sistema Unificado de Atenção a Sanidade Agropecuária

SUL – Sulfonamida

TET – Tetraciclina

IMP – Imipenem

AMC – Amoxicilina com ácido clavulânico

CLO – Cloranfenicol

GEN – Gentamicina

CTX – Cefotaxima

CAZ - Ceftazidima

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características do gênero *Salmonella* spp.

As salmonelas pertencem à família *Enterobacteriaceae* e morfologicamente são bastonetes gram-negativos, geralmente móveis e que formam gás e ácido a partir da fermentação da glicose, excetuando-se os sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, que são imóveis e não produzem gás (ANVISA, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Apresentam também capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, redução de nitrato a nitrito e a utilização do citrato como única fonte de carbono (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Atualmente, o gênero *Salmonella* spp. divide-se em três espécies: *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* e *Salmonella subterranea*, sendo essas divididas em subespécies, as quais são subdivididas em diversos sorovares ou sorotipos (ANVISA, 2012). A *Salmonella enterica* é subdivida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Diversos sorovares de *Salmonella enterica* são reconhecidos em cada subespécie, contabilizando no total 2.610 sorovares distribuídos na seguinte proporção: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (1.547 sorovares); *Salmonella enterica* subsp *salamae* (513 sorovares); *Salmonella enterica* subsp *arizonae* (100 sorovares); *Salmonella enterica* subsp *diarizonae* (341 sorovares); *Salmonella enterica* subsp *houtenae* (73 sorovares) e *Salmonella enterica* subsp. *indica* (13 sorovares) (ANVISA, 2012; KOWALSKI et al., 2011; MENDONÇA, 2016; OLIVEIRA et al., 2012; PERIN, 2017).

A distinção entre os diferentes sorotipos é realizada de acordo com certas estruturas antigênicas superficiais das células e os dois antígenos de superfície principais são: o antígeno O e o antígeno H, os quais apresentam alta variabilidade (MENDONÇA, 2016; PERIN, 2017; SANTOS, et al., 2013). O antígeno O é um polissacarídeo que compõe a membrana celular e que geralmente é composto por 4 ou 6 açúcares. O antígeno H é uma porção filamentosa do flagelo bacteriano e é constituído de subunidades proteicas denominadas flagelinas (PERIN, 2017). Há ainda o antígeno Vi, este é um antígeno capsular encontrado em apenas três sorotipos

de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*: Typhi, Paratyphi e Dublin (MENDONÇA, 2016; PERIN, 2017).

Na forma da redação da nomenclatura atual, os sorotipos ou sorovares não são mais considerados espécies (nomenclatura antiga: *Salmonella typhimurium*), razão pela qual os sorovares da subespécie *enterica* devem ser designados da seguinte maneira: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ou, de maneira mais simples e objetiva, *Salmonella* sorovar Typhimurium ou ainda *Salmonella* Typhimurium. Portanto, na nomenclatura atual, os sorovares Typhimurium, Agona, Enteritidis, entre outros, não indicam uma espécie, motivo pelo qual o sorovar não deve ser escrito em itálico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

O habitat natural das salmonelas pode ser dividido em três categorias, sendo elas: salmonelas altamente adaptadas ao homem (incluindo *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica tifóide e paratifóide), salmonelas altamente adaptadas aos animais (representadas por *S. Dublin* em bovinos, *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* em suínos, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em aves, responsáveis pelo paratifo dos animais) e salmonelas zoonóticas que atingem indiferentemente o homem e os animais (ANVISA, 2012).

As cepas mais frequentemente envolvidas nas doenças humanas são as de *S. enterica* subsp. *enterica*, que tem por habitat os animais de sangue quente e repondem por 99% das salmoneloses humanas. *S. enterica* subsp. *salamae*, subsp. *arizonae* e subsp. *diarizonae* são frequentemente isoladas do conteúdo intestinal de animais de sangue frio e raramente de humanos ou animais de sangue quente. *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. bongori* são predominantemente isoladas do ambiente e raramente são patogênicas para humanos (MENDONÇA, 2016).

Do ponto de vista clínico, de acordo com a patologia causada, dois grandes grupos podem ser considerados: Salmonelas tifoparatíficas (*Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A, B e C) e Salmonelas gastroentéricas (principalmente *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Infantis e Choleraesuis) (VÁZQUEZ et al., 2014).

1.2. *Salmonella* em alimentos

Salmonella é o principal agente envolvido em surtos de origem alimentar no Brasil, na Europa e nos Estados Unidos (BRASIL, 2015; CDC, 2014; EFSA, 2015).

Dados do Ministério da Saúde mostraram que no ano de 2015 foram identificados 673 surtos de origem alimentar no Brasil (BRASIL, 2016 a). Entre os anos 2000 e 2015, foram notificados 10.666 surtos com 155 óbitos e *Salmonella* aparece como o principal agente, reportado em 14,4% dos surtos (BRASIL, 2015).

Estima-se que até 95% do total de casos de salmonelose sejam decorrentes do consumo de alimentos contaminados (PERIN, 2017). A *Salmonella* é bastante difundida em todo o mundo e é eliminada em grande quantidade nas fezes, contaminando o solo e a água e sua sobrevivência no meio ambiente pode ser muito longa, principalmente na matéria orgânica. As salmonelas, em comparação com outros bastonetes gram-negativos, são relativamente resistentes a vários fatores ambientais e isso ocorre devido a sua constituição genética que possibilita sua adaptação em diferentes ambientes e animais, sendo que o trato intestinal de animais e humanos é o seu principal habitat (ANVISA, 2012; MENDONÇA, 2016; PERIN, 2017).

Salmonella é uma bactéria predominante em animais de produção, podendo ser comumente encontrada no intestino de aves, suínos, bovinos. Por ser normalmente encontrada no ambiente de produção animal é, conseqüentemente, muito isolada em alimentos de origem animal e, por isso, relacionada a grandes problemas de saúde pública, pelo seu envolvimento com doenças de origem alimentar no mundo todo. As salmonelas zoonóticas atingem indiferentemente o homem e os animais e são as responsáveis por quadros de gastroenterites ou Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), sua distribuição é mundial, sendo os alimentos de origem animal, como ovos, carnes e produtos lácteos os principais veículos de sua transmissão (ANVISA, 2012; WHO, 2015).

A maioria das pessoas infectadas por *Salmonella* desenvolvem diarreia, febre, náuseas, às vezes acompanhada de vômitos e cólicas abdominais. O início dos sintomas da doença ocorre entre 6 e 72 horas, com média entre 12 e 36 horas após a infecção, podendo durar de 2 a 7 dias. Nas pessoas adultas em condição física normal, a gastroenterite se resolve sem tratamento após 3-5 dias. Entretanto, em pacientes imunocomprometidos, idosos e crianças, infecções sistêmicas, tais como bacteremia e meningite, podem se desenvolver e requerem tratamento antimicrobiano. Além desses pacientes, o tratamento antimicrobiano também pode ser requerido em pacientes com diarreia severa. O estágio de portador persiste por até

nove semanas em 90% dos adultos. A frequência desse estágio de portador de *Salmonella* entre manipuladores de alimentos usualmente é reduzida a 0,5%. Entre esses profissionais, normas de educação e higiene no manuseio de alimentos representam os principais aspectos para minimizar o risco de transmissão alimentar (ANVISA, 2012; MENDONÇA, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; PERIN, 2017).

1.3. *Salmonella* na cadeia produtiva do frango de corte

Dentro da cadeia de produção e processamento de frango de corte, a transmissão da *Salmonella* pode ocorrer de diferentes formas, com isso, sua epidemiologia se torna complexa, sendo difícil determinar a forma em que o lote de aves foi contaminado (MENDONÇA, 2016). As aves ou o produto final, carne e ovos, estão susceptíveis a várias formas de contaminação, podendo esta ocorrer na granja, durante o transporte ou na indústria de processamento. É importante que seja verificado em cada uma dessas etapas se há ou não a presença de *Salmonella* spp. (SANTOS et al., 2013).

A *Salmonella* spp. é um microrganismo patogênico de bastante preocupação na produção avícola, pois se dissemina facilmente no ambiente de criação animal (MENDONÇA, 2016; PERIN, 2017; SANTOS et al., 2013). A frequente ocorrência de roedores e insetos nas granjas constitui um fator facilitador para a disseminação de *Salmonella*. Isso ocorre devido ao fácil acesso que os roedores têm ao local das rações, podendo assim pelas suas fezes contaminar com *Salmonella* as rações que irão servir de alimento para as aves; já os insetos estão em contato direto com as fezes das aves e assim passam a albergar diversas bactérias, entre elas *Salmonella* (MENDONÇA, 2016). Os animais ocupam o ponto central na epidemiologia das salmonelas entéricas, por isso é importante que se tenha o controle de vetores, como roedores e moscas, pois estes representam uma fonte de infecção de grande importância sanitária, porém de difícil controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011; KICH; MALGARIN, 2015).

As operações de abate e processamento das carcaças também contribuem para a disseminação de salmonelas por meio da água de escaldagem, utensílios contaminados, no manuseio inadequado durante o corte e evisceração e no acondicionamento que normalmente é realizado à temperatura ambiente. Por isso é

importante que se tenha medidas de controle no processo de abate, pois se sabe que isso causa grande redução na contaminação das carcaças com *Salmonella* (BONI et al., 2011; KICH; MALGARIN, 2015).

Em um estudo desenvolvido por Medeiros et al. (2011), no Brasil, verificou-se que os sorovares mais comumente isolados de carcaças de frango foram *S. Enteritidis*, *S. Infantis* e *S. Typhimurium*, os quais são os principais associados com a doença em humanos. Por muitos anos, e em todo o mundo, os sorotipos mais importantes na transmissão de salmonelas de animais para humanos foram *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Juntamente a estes sorovares, atualmente, o sorovar *Infantis* também tem sido bastante incriminado pelo envolvimento em casos de infecção alimentar (MENDONÇA, 2016; PERIN, 2017; WHO, 2015).

Apesar de todo avanço tecnológico e cuidados para garantir a produção de carnes de frango com qualidade microbiológica, observa-se que a *Salmonella* ainda está presente ao longo da cadeia de produção do frango de corte (MENDONÇA, 2016). São necessárias medidas conjuntas visando o cuidado com as aves no ambiente de criação, cuidados também durante o abate, manuseio e processamento da carne (SANTOS et al., 2013). Medidas como limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos e também a prevenção de contaminações cruzadas contribuem para a redução dos níveis de contaminação das carcaças com *Salmonella* (MENDONÇA, 2016).

1.4. Legislação brasileira em relação ao controle de *Salmonella* na cadeia produtiva do frango de corte

Para fins de vigilância epidemiológica, os estabelecimentos avícolas de corte, postura e recria deverão ser submetidos a coletas regulares de amostras para a realização de testes bacteriológicos de isolamento e tipificação para *Salmonella* (BRASIL, 2013). Além das coletas regulares, o serviço veterinário oficial pode determinar a realização de coletas aleatórias, bem como o aumento do número de amostras a serem colhidas e o número de aviários a serem amostrados para *Salmonella* spp. (BRASIL, 2013).

As coletas de amostras devem ser realizadas o mais próximo possível da data do abate do lote das aves, de tal maneira que os resultados sejam conhecidos antes

do seu envio para o abate. No momento da coleta das amostras, as aves não deverão estar sob efeito de agentes antimicrobianos para bactérias gram-negativas e não deverá ser utilizado nenhum produto com ação antimicrobiana no ambiente. Após serem coletadas, as amostras serão acondicionadas e enviadas o mais breve possível ao laboratório, essas amostras deverão estar com lacres invioláveis e numerados (BRASIL, 2016 b).

Os testes laboratoriais para *Salmonella* spp. devem ser realizados nos laboratórios oficiais e os resultados devem ser emitidos em formulário padronizado pelo MAPA (BRASIL, 2013). Os custos referentes à coleta, ao envio e à realização do ensaio laboratorial, serão de responsabilidade do estabelecimento avícola. Os diagnósticos positivos para *Salmonella* spp. deverão ser encaminhados imediatamente pelo laboratório ao SVE (Serviço Veterinário Estadual) para a interpretação dos resultados, um núcleo será considerado positivo quando pelo menos um ensaio de qualquer galpão do núcleo apresentar diagnóstico positivo para esse agente patogênico. Um núcleo positivo implicará que todo lote de frangos ou perus de corte alojado no momento da coleta das amostras será considerado positivo, independentemente do número de aves e galpões existentes no núcleo (BRASIL, 2016 b).

Para cada galpão do núcleo de origem das aves será emitido um Boletim Sanitário com o resultado do ensaio laboratorial correspondente a todo o núcleo. Os estabelecimentos de abate deverão instituir em seus programas de autocontrole ações de controle e monitoramento de *Salmonella* spp., desde a obtenção da matéria-prima até o produto (BRASIL, 2016 b). Quando as aves provenientes de núcleos que realizaram a vigilância epidemiológica para *Salmonella* spp. forem enviadas para abate, devem constar no Boletim Sanitário de abate dessas aves as informações referentes aos testes laboratoriais realizados, tais como: número de laudo laboratorial, identificação do laboratório que realizou os testes, datas da colheita de amostras e da emissão do resultado, e os resultados dos testes (BRASIL, 2013).

O monitoramento de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus será realizado pelos estabelecimentos de abate registrados no SIF (Serviço de Inspeção Federal) por meio de ciclos de amostragem, o ciclo de amostragem será composto pelo número de amostras a serem coletadas e o número máximo de amostras positivas aceitáveis. Para a interpretação dos resultados, será utilizado o plano de

duas classes, no qual deve constar presença ou ausência de *Salmonella* spp. Os estabelecimentos deverão manter o índice de contaminação por *Salmonella* spp. não superior ao número máximo de amostras positivas aceitáveis, pois se for superior o ciclo será considerado violado. O ciclo somente será finalizado depois do recebimento do último resultado (BRASIL, 2016 b).

A coleta das amostras será realizada aleatoriamente, após serem coletadas, as amostras serão acondicionadas e enviadas o mais breve possível ao laboratório, mantendo a temperatura entre zero grau centígrado e oito graus centígrados. O estabelecimento poderá escolher o laboratório que realizará o ensaio, deste que seja seguido às exigências e às metodologias preconizadas pela CGAL/SDA/MAPA (BRASIL, 2016 b).

O abate de frango e perus de corte que foram positivos para *Salmonella* spp., deve ser realizado separado dos demais lotes, e em seguida se deve fazer higienização das instalações e equipamentos. O SIF realizará a verificação do controle de *Salmonella* spp. em frangos e perus nos estabelecimentos de abate por meio de ciclos de amostragem oficiais, o sorteio das amostras oficiais será realizado e divulgado pelo Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, sendo que as amostras oficiais serão analisadas nos laboratórios que integram a rede nacional de laboratórios agropecuários do SUASA (Sistema Unificado de Atenção a Sanidade Agropecuária) (BRASIL, 2016 b).

As culturas positivas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras oficiais serão encaminhadas até o dia cinco de cada mês para o laboratório responsável pela identificação do sorovar. Quando forem identificados os sorovares *Salmonella* Typhimurium ou *Salmonella* Enteritidis o laboratório responsável notificará imediatamente ao SIF correspondente. Serão aplicadas sanções administrativas previstas na legislação aos responsáveis pelos estabelecimentos avícolas, que não seguirem as determinações constantes na instrução normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016 e esses estabelecimentos terão até 120 dias para se adequarem (BRASIL, 2016 b).

1.5. *Salmonella* spp. e resistência aos antimicrobianos

A resistência microbiana é a habilidade que o microrganismo possui de continuar íntegro mesmo na presença de níveis terapêuticos de determinado antimicrobiano. Essa resistência pode ser classificada em: intrínseca ou natural e adquirida. A resistência intrínseca resulta da mutação espontânea do material genético que confere alguma nova adaptação, permitindo que o organismo resista aos efeitos letais do agente antimicrobiano (as mutações podem ser substituições de base, mutações de deslocamento de quadros, deleções de material genético ou inserções de elementos de DNA). A resistência adquirida é aquela obtida por meio de mutação no DNA ou aquisição dos genes de resistência de outras bactérias, podendo ser por meio de conjugação, transdução ou transformação (COSBY et al, 2015; ANVISA, 2012; MENDONÇA, 2016).

Alguns fatores importantes no desenvolvimento de resistência incluem pressões seletivas, proliferação de múltiplos clones resistentes e a incapacidade de detectar fenótipos emergentes. As pressões seletivas estão relacionadas a práticas como a prescrição exagerada de antimicrobianos, pacientes que se automedicam e também os que não finalizam o tratamento, além da utilização de doses subterapêuticas em animais de produção (PERIN, 2017; COSBY et al, 2015).

Os mecanismos de resistência bacteriana variam e os mecanismos mais conhecidos podem ser exemplificados de duas formas: o mecanismo mais comum é aquele no qual as bactérias produzem proteínas específicas, geralmente enzimas, que destroem o antibiótico ou impedem que o mesmo se ligue no sítio de ação (um exemplo é a produção de beta lactamases por salmonelas que inativam a classe de antimicrobianos beta lactâmicos). Um segundo mecanismo é a bomba de efluxo presente no interior do microrganismo, esta bombeia ativamente o antimicrobiano para fora da bactéria de forma que as concentrações antimicrobianas na célula nunca atinjam o limiar necessário para interferir nos processos metabólicos da célula (a resistência à tetraciclina e ao cloranfenicol em isolados de *Salmonella* spp. são exemplos de bombas de efluxo) (COSBY et al, 2015).

Houve um significativo aumento da resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos no final da década de 80. A resistência das bactérias aos

antimicrobianos é algo que vem causando grandes preocupações, pois as opções farmacológicas para o tratamento de infecções bacterianas estão ficando cada vez mais reduzidas (ANVISA, 2012; MENDONÇA, 2016; KAO et al, 2017). Segundo o relatório da Anvisa (2012), os maiores percentuais de resistência para cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango no Brasil foram para: estreptomicinas (89,3%), sulfonamidas (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%) e ácido nalidíxico (44,0%).

Os aminoglicosídeos são drogas eficazes para o tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos e são geralmente usadas em combinação com β -lactâmicos para garantir um amplo espectro de ação. Os representantes deste grupo são: gentamicina, neomicina, espectinomicina, estreptomicina, tobramicina e amicacina. O mecanismo de ação dessas drogas consiste na alteração da função dos ribossomos bacterianos pela ligação a fração 30S, inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas defeituosas. O mecanismo para *Salmonella* resistir aos aminoglicosídeos é em sua maioria, a produção de enzimas inativantes dos aminoglicosídeos, como as O-adeniltransferases e N-acetiltransferases (COSBY et al, 2015; MENDONÇA, 2016).

Em *Salmonella* spp. os genes O-adeniltransferases mais comuns são do tipo *aadA* e *aadB*. O primeiro confere resistência à estreptomicina e espectinomicina, enquanto o segundo confere resistência à gentamicina e tobramicina. E os genes de N-acetiltransferase mais comuns em *Salmonella* são *aac(3)* e *aac(6')*. Os genes *aac(3)* mediam resistência a gentamicina e foram encontrados em diferentes sorovares como Enteritidis, Typhimurium, Typhi e Choleraesuis (MICHAEL et al., 2006).

As sulfonamidas são drogas bacteriostáticas e de largo espectro de ação. Atuam na síntese do ácido fólico, necessário para a síntese do ácido nucleico, interferindo assim na síntese do DNA. A resistência às sulfas acontece por meio de aquisição de plasmídeos que diminuem a permeabilidade do antimicrobiano na bactéria ou que codificam enzimas com pouca afinidade pelo antimicrobiano (ALTERTHUM, 2008). O uso das sulfonamidas, tanto na medicina humana quanto na veterinária, tem levado à resistência a estes compostos em *Salmonella* spp. A resistência ocorre geralmente pela aquisição de dois genes denominados *su1* e *su2*, que codificam uma enzima necessária à síntese do ácido fólico (LYNNE et al., 2008).

Na classe dos antimicrobianos fenicóis estão incluídos o cloranfenicol e o florfenicol. O cloranfenicol exerce atividade bacteriostática por se ligar a subunidade 50S do ribossomo bacteriano, inibindo a síntese proteica da bactéria e possuindo atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. A resistência em isolados de *Salmonella* é conferida por dois mecanismos: inativação enzimática do antibiótico pela cloranfenicol-acetiltransferase e remoção do antibiótico por bomba de efluxo (ALTERTHUM, 2008; COSBY et al, 2015). A expulsão ativa do cloranfenicol/florfenicol em *Salmonella* ocorre através de dois tipos de proteínas transportadoras (Cml e Flo). A proteína Cml é codificada pelo gene *cmlA* e é responsável pelo transporte de cloranfenicol. Já a proteína Flo é capaz de mobilizar tanto o cloranfenicol como o florfenicol, sendo codificada por genes *flo* em diferentes sorovares de *Salmonella* (DOUBLET et al., 2004).

Penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos são as três principais classes de β -lactâmicos. Esses antimicrobianos exercem sua atividade bactericida por interferir na síntese do peptidoglicano, sendo este um componente da parede celular bacteriana. Os β -lactâmicos agem tanto em bactérias gram-negativas quanto em gram-positivas. O mecanismo mais conhecido de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos é a produção de enzimas betalactamases pelas bactérias, que hidrolisam os anéis β -lactâmicos. Os genes que codificam a produção de betalactamases são tipicamente transportados em plasmídeos (COSBY et al, 2015; MENDONÇA, 2016).

As β -lactamases detectadas em *Salmonella* spp. constituem um diverso grupo de enzimas codificadas por um considerável número de genes. Pelo menos 10 diferentes subgrupos de genes das β -lactamases *bla* já foram descritos: TEM, SHV, PSE, OXA, PER, CTX-M, CMY, ACC, DHA ou KPC, destacando-se os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX}, e *bla*_{CMY} por codificar enzimas β -lactamases de espectro estendido (MICHAEL et al., 2006).

As tetraciclinas possuem amplo espectro de ação, são geralmente bacteriostáticas e a resistência adquirida a essa classe é algo muito comum entre as bactérias. As tetraciclinas agem impedindo a ligação de tRNA a subunidade ribossômica 30S, inibindo assim a síntese de proteínas. A resistência à tetraciclina em isolados de *Salmonella* é geralmente atribuída à produção de uma bomba de efluxo que remove a tetraciclina da célula bacteriana. Existem pelo menos 32 diferentes genes que conferem resistência à tetraciclina como o tetA, o tetB, o tetC, o tetD, o

tetG e o tetH encontrados mais frequentemente em *Salmonella*. O tetA e tetB possui elevada frequência e é encontrado em grande número de sorovares, enquanto tetC e tetD são mais raros (ALTERTHUM, 2008; COSBY et al, 2015; MENDONÇA, 2016).

Quinolonas e fluoroquinolonas como a ciprofloxacina são drogas bactericidas cujo mecanismo de ação está relacionado com a interferência na síntese de DNA do microrganismo, causando a inibição da DNA girase. A resistência às quinolonas pode ocorrer devido à mutação que causa a alteração dos sítios de ligação da DNA girase, fazendo que com esta não sofra a ação do antimicrobiano e também devido a mutação que altera a permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana. Outro fator determinante de resistência é a ocorrência de bomba de efluxo causando a diminuição no acúmulo do agente no interior da bactéria (ALTERTHUM, 2008; ANVISA, 2007).

Atualmente sabe-se que a resistência as quinolonas pode ocorrer por meio de transferência do gene de resistência por plasmídeos. O gene *qnr* é descrito como responsável por conferir resistência às quinolonas e esse gene codifica a proteína Qnr que proporciona proteção a DNA girase da ação da ciprofloxacina (COSBY et al, 2015; MENDONÇA, 2016). Plasmídeos carreadores do gene *qnr* (*qnrA*, *qnrB* e *qnrS*) foram relatados no gênero *Salmonella* em diversos países como França, Holanda e Dinamarca (CATTOIR et al., 2007; TORPDAHL et al., 2009; VELDMAN; VAN PELT; MEVIUS, 2008). No Brasil, foi demonstrada uma baixa porcentagem de resistência à ciprofloxacina em cepas de *Salmonella* isoladas de carcaça de frango (0,4%) (ANVISA, 2012).

A resistência aos antimicrobianos é considerada pelas principais organizações mundiais de saúde um grande desafio do século XXI. A resistência crescente levanta a preocupação de que se pode entrar na “era pós-antibiótica”, o que significa que haverá um período em que não teremos antimicrobianos eficazes disponíveis para o tratamento de muitas infecções. Determinar o perfil de resistência de *Salmonella* faz-se importante tanto para o estabelecimento de suas características dentro da cadeia produtiva do frango, quanto para a medicina humana, pois, a partir dos resultados obtidos pode-se fazer uma correlação do uso de antimicrobianos nas duas áreas, baseando-se nas características de resistência obtidas (COSBY et al, 2015; MENDONÇA, 2016).

2. JUSTIFICATIVA

As salmoneloses são um dos maiores problemas de saúde pública nos casos de Doenças Transmitidas por Alimentos. Nas aves, o estado de portador de *Salmonella* é um importante fator epidemiológico, sendo as aves de corte uma fonte de contaminação do meio ambiente e dos produtos de origem animal. Adicionalmente, as operações de transporte pré-abate e processamento da carcaça na indústria podem, por meio da contaminação cruzada, aumentar o percentual de positividade. Estes fatores têm contribuído para que a *Salmonella* continue a ser um dos patógenos mais identificados em produtos avícolas expostos ao consumo. As carcaças de frango bem como seus cortes e outros derivados chegam ao momento do preparo culinário com percentuais variados de contaminação por *Salmonella* spp. (KOWALSKI et al., 2011; SANTOS et al., 2013; STERZO et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa de *Salmonella enterica* em carnes de frango comercializadas em supermercados do Distrito Federal e avaliar a resistência antimicrobiana das bactérias isoladas.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação do gene de virulência *invA* das bactérias *Salmonellas isoladas*.
- Realizar teste de susceptibilidade antimicrobiana das bactérias *Salmonellas* isoladas utilizando o método de difusão com disco.

4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS *SALMONELLA ENTERICA* ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL

Larissa Ribeiro Gonçalves, Izabel Cristina Rodrigues da Silva, Daniela Castilho Orsi

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

RESUMO

As salmonelas são bastonetes gram-negativos, tem como principal habitat o trato intestinal de humanos e animais, sendo a espécie *Salmonella enterica* o principal agente envolvido em surtos de origem alimentar no Brasil. O objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa de *Salmonella enterica* em carnes de frango comercializadas em supermercados do Distrito Federal e avaliar a resistência antimicrobiana das bactérias isoladas. Foram coletadas onze amostras de carne de frango resfriadas de diferentes cortes (peito, coxa, sobrecoxa e coxinha da assa) e de diferentes supermercados. Realizaram-se testes bioquímicos para triagem de *Salmonella* spp. e os isolados suspeitos foram identificados através da técnica de PCR. A susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer). O presente estudo mostrou alta prevalência de *Salmonella enterica* nas carnes de frango. Das 25 cepas testadas, os antibióticos aos quais as cepas apresentaram maior resistência foram: amoxicilina, sulfonamida e tetraciclina. Dez cepas (40%) foram classificadas como multirresistentes, isto é, cepas resistentes a três antibióticos ou mais. A utilização indiscriminada de antibióticos na avicultura causa uma pressão seletiva, levando a indução de cepas resistentes e multirresistentes com a possibilidade de transmissão tanto para outras aves quanto para homens saudáveis, gerando prejuízos financeiros a avicultura e à saúde pública. Com isso é importante que se tenha medidas mais rigorosas de fiscalização para um maior controle de contaminação da carne de frango por *Salmonella* spp.

Palavras-chave: *Salmonella enterica*, resistência antimicrobiana, carnes de frango.

ABSTRACT

Salmonella are gram-negative bacilli; whose main habitat is the intestinal tract of humans and animals. The *Salmonella enterica* species is the main agent involved in food-borne outbreaks in Brazil. The aim of this study was to perform *Salmonella enterica* research on chicken meat commercialized in supermarkets in the Federal District and to evaluate the antimicrobial resistance of the isolated bacteria. Eleven samples of cooled chicken meat from different cuts (chest, thigh, over thigh and wing thigh) and from different supermarkets were collected. Biochemical tests were performed for screening *Salmonella* spp. and the suspected isolates were identified by the PCR technique. The susceptibility of the strains to the antimicrobials was evaluated by the disc-diffusion technique (Kirby-Bauer method). The present study showed a high prevalence of *Salmonella enterica* in chicken meat. Of the 25 strains tested, the antibiotics to which the strains showed the highest resistance were: amoxicillin, sulfonamide and tetracycline. Ten strains (40%) were classified as multiresistant, ie strains resistant to three or more antibiotics. The indiscriminate use of antibiotics in poultry farming causes selective pressure, leading to the induction of resistant and multiresistant strains with the possibility of transmission to both chickens and healthy humans, causing financial losses to poultry and public health. So, it is important to have stricter enforcement measures for greater control of contamination of chicken meat with *Salmonella* spp.

Keywords: *Salmonella enterica*, antimicrobial resistance, chicken meats

INTRODUÇÃO

A produção brasileira de carne de frango alcançou 13,1 milhões de toneladas no ano de 2016. Com este resultado, o Brasil se consolidou como 2º maior produtor de carne de frango do mundo e 1º exportador do produto no mundo. Sendo o Brasil um grande consumidor, produtor e exportador de carne de frango, é fundamental buscar constantemente a qualidade e a segurança alimentar desse produto (ABPA, 2016).

Entre os patógenos bacterianos veiculados na avicultura, destaca-se o gênero *Salmonella*. No gênero *Salmonella* spp., destaca-se a espécie *Salmonella enterica* subsp *enterica* sorovar Enteritidis, causadora de infecções alimentares em seres humanos, através do consumo, principalmente, de produtos de origem avícola, como carne, ovos e seus derivados. A partir da década de 1990, no Brasil, a *Salmonella* Enteritidis passou a ser o sorotipo mais identificado nos casos de infecção alimentar em seres humanos (KOWALSKI et al., 2011; SANTOS et al., 2013; STERZO et al., 2008).

A epidemiologia de *Salmonella* spp. na cadeia de produção de aves envolve a transmissão vertical, dos reprodutores para os embriões, desencadeando o nascimento de aves já infectadas. Envolve também a transmissão horizontal, com contaminação através da presença da bactéria no ambiente e ração, além da existência de diferentes animais que atuam como reservatório para a bactéria, como roedores e aves silvestres. As aves de corte estão entre os principais carreadores de *Salmonella* spp. em abatedouros, elas constituem importante reservatório do patógeno e apresentam alta correlação com contaminação cruzada (KOWALSKI et al., 2011; SANTOS et al., 2013; STERZO et al., 2008).

Sendo assim, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico no Controle da *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus, visando desenvolver um monitoramento constante do nível de contaminação pelo patógeno em estabelecimentos de abate de aves (BRASIL, 2003). Esse programa está vinculado aos resultados obtidos nas análises laboratoriais sistemáticas e contínuas de carcaças de frangos e perus in natura, envolvendo todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal. A principal função do monitoramento microbiológico é verificar a prevalência da *Salmonella* spp. nos produtos avícolas e assim formar um banco de dados dos índices de contaminação (BRASIL, 2003).

No dia 25 de outubro de 2016, o MAPA publicou a Instrução Normativa nº 20 (BRASIL, 2016) e revogou a Instrução Normativa nº 70 (BRASIL, 2003). As novas regras têm por

objetivo estabelecer o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal, a fim de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor (BRASIL, 2016).

A resistência bacteriana a antibióticos é um problema clínico e de saúde pública, havendo evidências de que o tratamento de animais com antibióticos de forma indiscriminada torne seus produtos e derivados fonte de resistência para microrganismos na espécie humana. É preocupante o aumento dos isolados de *Salmonella* spp. resistentes aos principais antibióticos utilizados nos tratamentos de surtos causados por este microrganismo (PINHEIRO et al., 2010; SILVA et al; 2014). Considerando que apesar do estabelecimento do programa de controle de *Salmonella* spp. na produção avícola, essa bactéria continua a ser um dos patógenos mais identificados em produtos avícolas expostos ao consumo, o objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa de *Salmonella enterica* em carnes de frango comercializadas em supermercados do Distrito Federal e avaliar a resistência antimicrobiana das bactérias isoladas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas.

As amostras de carne de frango foram coletadas em 4 diferentes supermercados do Distrito Federal, contabilizando o total de 11 amostras de diferentes cortes refrigerados de carnes de frango (peito, coxa, sobrecoxa e coxinha da asa). Todas as amostras transportadas resfriadas dos locais de estudo para o laboratório no tempo de 30-50 min. e no prazo máximo de 1 hora, após a coleta, foram iniciadas as análises microbiológicas no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade De Ceilândia, UnB. Para a pesquisa de *Salmonella* spp., primeiro foram pesadas 25 gramas de cada amostra em 225 mL de água peptonada 1% (p/v) e após 18 horas de incubação em estufa a 36°C (variando aproximadamente 1°C), alíquotas desse caldo de enriquecimento foram transferidas para os caldos seletivos selenito cistina e tetracionato e encubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, alíquotas foram transferidas dos caldos seletivos para os meios: ágar *Salmonella* Shigella (SS) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD). As colônias não fermentadoras de lactose (com ou sem pigmento preto) foram transferidas do SS e do XLD para o meio de cultivo Agar TSI (três açúcares e ferro). Os tubos

de TSI que apresentaram reações típicas de *Salmonella* spp. foram novamente repicadas para os meios SS e XLD e levados para a estufa a 37°C por 24 horas. As colônias puras isoladas do SS e XLD com característica típica de *Salmonella* spp. foram repicadas nos meios bioquímicos LIA (Lysina Iron Agar) e FA (Fenilalanina Agar) e incubadas na estufa bacteriológica entre 18 e 24 horas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas

A susceptibilidade das cepas aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (método Kirby-Bauer), utilizando protocolo recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2013). Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testados foram: amoxicilina com ácido clavulânico (10 µg) (β-lactâmico/penicilina), ceftazidima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), cefotaxima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), gentamicina (10 µg) (aminoglicosídeo), cloranfenicol (30 µg) (fenicol), imipenem (10 µg) (β-lactâmico/carbapenem), tetraciclina (30 µg) (tetraciclina), ciprofloxacina (5 µg) (quinolona) e sulfonamida (300 µg) (sulfonamida) (NEWPROV®). Os critérios de escolha para as drogas testadas incluíram pontos como utilização de antimicrobianos e ocorrência de resistência no meio avícola/humana. Quanto às zonas de inibição, estas foram determinadas pelas medidas dos halos formados, em milímetros, e classificadas como sensível, intermediário e resistente de acordo com as recomendações do CLSI (2013).

Identificação molecular de bactérias suspeitas de serem patogênicas

Os isolados suspeitos de serem *Salmonella* spp. foram identificados através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), partindo-se de culturas puras ressuspensas em caldo Luria Bertani. As colônias isoladas foram inoculadas, individualmente, e incubadas a 37°C por 18 horas. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel, Düren, Alemanha). A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNAI/HindIII marcador de 100 pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termociclagem foram 95°C por 2 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, seguida de 60°C por 1 minuto, para

o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 1 minuto para a extensão dos fragmentos. Os produtos de PCR submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídeo foram visualizados sob iluminação ultra-violeta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNAI/HindIII (JENA®). Para a identificação de *Salmonella enterica* foi utilizado o fragmento de 103 pares de base referente ao gene *invA*.

A Tabela 1 apresenta a sequência do primer para identificação do gene *invA* (anotação descrita para o gene que codifica as proteínas de invasão celular de *Salmonella enterica*).

Tabela 1. Sequência do primer e tamanho do produto amplificado na PCR para identificação do gene *invA*

Primer	Sequência 5´- 3´	Produto amplificado	Espécie
<i>invA</i> forward	GCTGATGCCGGTGAAATTAT	103 pb	<i>Salmonella</i>
<i>invA</i> reverse	TGTCACCGTGGTCCAGTTTA		<i>entérica</i>

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, do total de 11 amostras de diferentes cortes de carne de frango resfriadas, 10 amostras (90%) apresentaram o gene *invA* após análise molecular (Tabela 2).

Tabela 2. Prevalência de bactérias *Salmonella enterica* isoladas das amostras de carne de frango

Cortes de carne de frango	Número de amostras analisadas	Número de amostras positivas no teste molecular (gene <i>invA</i>)
Coxa	4	4
Coxinha da asa	3	2
Sobrecoxa	2	2
Peito (inteiro com pele e osso)	2	2
Total	11 (100%)	10 (90%)

O gene *invA* contém sequências exclusivas para o gênero *Salmonella*, além de ser um alvo adequado para PCR. Este gene é reconhecido como padrão internacional para detecção de *Salmonella*. A presença do gene *invA* indica que a bactéria *Salmonella* possui um eficiente mecanismo de entrada e invasão do epitélio intestinal e essa invasão é um fator de virulência essencial no processo de infecção causado por tal patógeno (MOURA, et. al., 2014; AMINI, et al., 2010; SHANMUGASAMY, et al., 2011). O operon *inv* (invasibility) é composto de sete genes *invABCDEFG*, sendo o gene *invA* o primeiro no operon, com função clara na invasão de células epiteliais. Sorotipos de *Salmonella enterica* que não possuem o gene *invA*, não expressam os genes *invABC* e por isso não são capazes de invadir células (OKAMOTO, 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

Outros estudos na literatura também fizeram a confirmação molecular de *Salmonella* através da detecção do gene *invA*. Nas análises de OKAMOTO et al. (2009), foram estudadas 100 cepas de *Salmonella enterica*, onde 97% apresentaram o gene *invA* por meio da técnica de PCR. No estudo realizado por MOURA et al (2014), das 86 cepas de *Salmonella* spp. estudadas, 100% apresentaram o gene *invA*. No estudo feito por LOPES (2011), de 44 isolados de *Salmonella* spp., 42 isolados (95,5%) apresentaram o gene *invA*. E no estudo realizado por

ABDELTAWAB et al (2013) de 45 isolados *Salmonella* spp., 100% apresentaram esse mesmo gene.

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 25 cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de carnes de frango, determinado através do teste de difusão em discos, está apresentado na Tabela 3. Os maiores índices de resistência antimicrobiana foram observados para amoxicilina com ácido clavulânico (96%), sulfonamida (40%) e tetraciclina (48%).

Tabela 3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *Salmonella enterica* isoladas das amostras de carnes de frango

Antibióticos	S n (%)	I n (%)	R n (%)	HALO S (mm)	HALO I (mm)	HALO R (mm)
Amoxicilina	1 (4)	0	24 (96)	>18	-	< 18
Sulfonamida	9 (36)	6 (24)	10 (40)	>17	12-17	< 12
Gentamicina	18 (72)	6 (24)	1 (4)	>15	12-15	< 12
Tetraciclina	11 (44)	1 (4)	12 (48)	>21	17-21	< 17
Cloranfenicol	22 (88)	2 (8)	1 (4)	>18	12-18	< 12
Ciprofloxacina	20 (80)	5 (20)	0	>21	15-21	< 15
Imipenem	7 (28)	15 (60)	3 (12)	>23	19-23	< 19
Ceftazidima	11 (71)	10 (8)	4 (21)	>26	22-26	< 22
Cefotaxima	22 (88)	2 (8)	1 (4)	>21	17-21	< 17

S = sensível; I = intermediário; R = resistente; n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de 25 cepas.

Estudos reportados na literatura revelaram um perfil variado de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* isoladas de frango. Em estudo realizado por MORAES et al. (2014), das 256 amostras de frango de corte retiradas do fluxo de produção, 12 amostras (4,7%) foram positivas para *Salmonella* e os maiores índices de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* isoladas foram observados frente à sulfonamida (73,3%). Já no estudo feito por FIGUEIREDO et al. (2013), que analisaram a resistência antimicrobiana em isolados de *Salmonella enterica* provenientes de alimentos de origem animal, de 94 amostras de aves

analisadas, 39 amostras (42%) foram positivas para *Salmonella* e os maiores índices de resistência antimicrobiana foram observados para a tetraciclina (31%) e ampicilina (21%). E no estudo realizado por SILVA et al. (2014), onde se analisou a resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos, das cepas de *Salmonella* isoladas, 58,8% apresentaram resistência a sulfonamida e penicilina G.

A Tabela 4 mostra a quantidade de antimicrobianos aos quais as cepas de *Salmonella* isoladas de carne de frango apresentaram resistência.

Tabela 4. Número de cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de carnes de frango com resistência aos antimicrobianos testados

Número de cepas	Cepas (%)*	Número de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência
1	4	5
1	4	4
8	32	3
8	32	2
6	24	1
1	4	0
25	100	Total

* % = porcentagem em relação ao total de 25 cepas.

Das 25 cepas de *Salmonella* analisadas, apenas uma cepa (4%) mostrou-se sensível a todos os antimicrobianos testados. Seis cepas (24%) apresentaram resistência a um tipo de antimicrobiano, enquanto oito cepas (32%) apresentaram resistência a dois tipos de antimicrobianos. Dez cepas (40%) foram classificadas como multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a três ou mais classes de antibióticos.

A Tabela 5 apresenta os perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* isoladas de carne de frango e cinco perfis de multirresistência foram identificados.

Tabela 5. Perfis de multirresistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella enterica* isoladas de carne de frango.

Perfis	Multirresistência antimicrobiana	Número de antimicrobianos*	Número de cepas (%)**
1	SUL, TET, IMP, GEN, AMC	5	1 (4%)
2	SUL, IMP, AMC, CAZ	4	1 (4%)
3	SUL, TET, AMC	3	6 (24%)
4	CLO, TET, GEN	3	1 (4%)
5	CTX, AMC, CAZ	3	1 (4%)

* Número de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram multirresistência; Número de cepas (%)** = número de cepas com perfil de multirresistência e porcentagem em relação ao total de 25 cepas; AMC = amoxicilina com ácido clavulânico, SUL = sulfonamida, TET = tetraciclina, CAZ = ceftazidima, GEN = gentamicina, IMP = imipenem, CTX = cefotaxima, CLO = cloranfenicol.

A literatura revela uma crescente presença de bactérias com múltipla resistência a agentes antimicrobianos. No estudo de SILVA et al. (2014), das vinte amostras de *Salmonella* analisadas, dez (50%) apresentaram multirresistência. Em estudo realizado por MEDEIROS et. al (2011), das duzentas e cinquenta cepas de *Salmonella* isoladas, 53,2% mostrou-se resistente a múltiplas drogas. Já em estudo feito por PERIN (2017), de noventa e oito isolados de *Salmonella*, oitenta e cinco isolados (86,7%) mostraram-se multirresistentes.

A *Salmonella* é um patógeno altamente adaptável, por isso pode estar presente na maioria dos produtos de origem animal e vegetal em nível mundial. O uso indiscriminado de antibióticos na avicultura exerce uma pressão seletiva, tornando assim mais fácil as cepas de *Salmonella* resistentes sobreviverem e serem transmitidas para os humanos por meio do consumo de alimentos. Portanto, é importante que se tenha um monitoramento contínuo da resistência e prevalência dessas bactérias, levando em consideração as implicações que a multirresistência pode causar a saúde (PERIN, 2017; AHMED et al., 2009; FARIA, 2013).

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram uma alta prevalência de *Salmonella* spp. na carne de frango comercializada nos supermercados do Distrito Federal. Em relação às onze amostras analisadas para a detecção de *Salmonella*, dez amostras (90%) apresentaram a bactéria, confirmada pela detecção do gene *invA* na análise molecular. Adicionalmente, das 25 cepas de *Salmonella enterica* isoladas das amostras de carne de frango, 10 cepas (40%) foram classificadas como multirresistentes. O surgimento de cepas resistentes está relacionado ao uso indiscriminado de antibióticos na produção animal. Com isso, fica evidente a importância de se adotar medidas para diminuir a incidência de *Salmonella enterica* na carne de frango, para que se possa garantir um produto com maior segurança alimentar para o consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

ABDELTAWAB, Ashraf Awad et al. Detection of common (*invA*) gene in *Salmonellae* isolated from poultry using polymerase chain reaction technique. **Benha Veterinary Medical Journal**, v. 25, n. 2, p. 70-77, 2013.

ABPA. 2016. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual. 2016. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf

AHMED, Ashraf Mohamed; SHIMABUKURO, Hirofumi; SHIMAMOTO, Tadashi. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* from retail chicken meat in Japan. **Journal of Food Science**, v. 74, n.7, p. 405-410, 2009.

AMINI, Kumarss et al. 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, n. 41, p. 2202-2210, 2010.

BRASIL. 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 70, 10 outubro de 2003. **Dispõe sobre o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico no Controle da *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus.** Diário Oficial da União, Brasília.

BRASIL. 2016. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 outubro de 2016. **Estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor.** Diário Oficial da União, Brasília. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/controle-de-patogenos/arquivos-controle-de-patogenos/SalmonellaIN202016Salmonella.pdf>

FARIA, Adriana Marques. **Principais sorotipos de *Salmonella entérica* isolados em suínos.** Universidade Federal de Goiás, p. 35, 2013. Disponível em <https://ppgca.evz.ufg.br/up/67/o/2013_Adriana_Marques_Seminario_1_corrigido_c.pdf> acesso em: 26 de fevereiro de 2019.

FIGUEIREDO, Rui et al. Resistência a antibióticos em isolados de *Salmonella entérica* em alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.108, n. 585-586, p. 39-43, 2013.

LOPES, Thais Janaina. ***Salmonella* spp. na cadeia de produção de carne bovina de exportação: ocorrência, perfil de susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência e perfil de macrorrestrrição por PFGE.** Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, 98 p., 2011.

KOWALSKI, Luciana Helena. et al. Salmoneloses emergentes de origem aviária. **PUBVET**, v. 5, n. 34, 2011.

MEDEIROS, Marcelo Augusto Nunes; OLIVEIRA, Diana Carmen Nunes de; RODRIGUES, Dália dos Prazeres; FREITAS, Daniel Roberto Coradi de. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salude Pública**, v. 30, n. 6, p. 555–560, 2011.

MOURA, Marcoeli Silva de. et al. Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de amostras de origem suína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.5, p.1367-1375, 2014.

MORAES, Dunya Mara Cardoso. et al. Fontes de infecção e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. isoladas no fluxo de produção de frango de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, n. 3, p. 195-201, 2014.

OKAMOTO, Adriano Sakai. **Detecção dos genes integron, invA e spvC em *Salmonella enteritidis* proveniente de material avícola e transferência horizontal do gene integron entre enterobactérias.** Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista, 88 p., 2009.

OLIVEIRA, Pedrosa Aline de. et al. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade, **Enciclopédia Biosfera**, v.9, n.16, p. 1947-1972, 2013.

PERIN, Ana Paula. **Ocorrência e quantificação de *Salmonella* sp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no Estado do Paraná e perfil de suscetibilidade e antimicrobianos.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 103 p., 2017.

PINHEIRO, Liliane; MELO, Roberta Torres de; MENDONÇA, Eliane Pereira.; COELHO, Letícia Rísoli; MONTEIRO, Guilherme Paz; ROSSI, Daise Aparecida. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de granjas avícolas. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 34, p. 938-943, 2010.

SANTOS, José Rodolfo et al. A importância do controle da *Salmonella* na cadeia produtiva de frangos de corte. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p. 167-174, 2013.

SHANMUGASAMY, Malmarugan; VELAYUTHAM, Thenmozhi; RAJESWAR, Johnson. InvA gene specific PCR for detection of *Salmonella* from broilers. **Veterinary World**, v. 4, n. 12, p. 562-564, 2011.

SILVA, Carla Ferreira da. et al. *Salmonella enteritidis* formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 2014.

SILVA, Carolina Janelli.; TEJADA, Talita Schneid.; TIMM, Cláudio Dias. Resistência de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v.8, n.4, p. 120-131, 2014.

STERZO, Vinicius. et al. Salmoneloses aviárias. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 129-138, 2008.

5. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ALTERTHUM, Flávio. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**: Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango. 1.ed. Brasília, 2012. 171 p.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Brasília, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm>.

BONI, Helena Fumy Kogushi; CARRIJO, Alfredo Sampaio; FASCINA, Vitor Barbosa. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1, p.84-95, 2011.

BRASIL. 2016 a. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>

BRASIL. 2016 b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 20, de 21 outubro de 2016. **Estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de**

Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor. Diário Oficial da União, Brasília. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/control-de-patogenos/arquivos-control-de-patogenos/SalmonellaIN202016Salmonella.pdf>>

BRASIL. 2015. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.** Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>

BRASIL. 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 10, de 11 de abril de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília. Disponível em: <http://www.avimig.com.br/galeria_imagens/LEGISLACAO_04112016_094044.pdf> acesso em: 16 de agosto de 2018.

CATTOIR, Vincent. et al. Prevalence of *qnr* genes in *Salmonella* in France. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 751-754, 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report), 2014.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement.** CLSI M100-S23, Wayne, 2013.

COSBY, Douglas Earl. et al. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: a review. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 3, p. 408-426, 2015.

DOUBLET, Benoit. et al. Plasmid-mediated florfenicol and ceftriaxone resistance encoded by the *floR* and *bla*CMY-2 genes in *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Newport isolated in the United States. **FEMS Microbiology Letters**, v. 233, n. 2, p. 301–305, 2004.

EFSA. European Food Safety Authority. The european union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. **EFSA Journal**, v.13, n.1, p.165, 2015.

KAO, Cheng-Yen et al. Molecular characterization of antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates: First identification of a plasmid carrying *qnrD* or *oqxAB* in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 50, n. 2, p. 214-223, 2017.

KICH, Jalusa Deon; MALGARIN, Carolina Maciel. Controle de *Salmonella* na suinocultura. In: **Embrapa Suínos e Aves-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 17. 2015, Campinas. Anais... Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, v. 1, p. 98-107, 2015.

KOWALSKI, Luciana Helena. et al. Salmoneloses emergentes de origem aviária. **PUBVET**, v. 5, n. 34, 2011.

LYNNE, Aaron. et al. Antimicrobial resistance genes associated with *Salmonella enterica* sorovar newport isolates from food animals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 353-356, 2008.

MEDEIROS, Marcelo Augusto Nunes et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555–560, 2011.

MENDONÇA, Eliane Pereira. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde**

pública, isolados de frangos de corte no Brasil. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, 132 p., 2016.

MENDONÇA, Eliane Pereira et al. Ribotipagem de *Salmonella* na cadeia avícola– Revisão de literatura. **PUBVET**, v. 5, p. 1043-1049, 2011.

MICHAEL, Geovana Brenner. et al. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1898-1914, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial da *Salmonella spp.*** 1. ed. Brasília, DF, 2011. 64 p. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>

OLIVEIRA, Aline Pedrosa. et al. *Salmonella* sp. e o abate de frangos: pontos críticos de controle, **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n. 14, p. 865-875, 2012.

PERIN, Ana Paula. **Ocorrência e quantificação de *Salmonella* sp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no Estado do Paraná e perfil de suscetibilidade e antimicrobianos.** Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná, 103 p., 2017.

SANTOS, José Rodolfo et al. A importância do controle da *Salmonella* na cadeia produtiva de frangos de corte. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 12, n. 3, p. 167-174, 2013.

SILVA, Carolina Janelli; TEJADA, Talita Schneid.; TIMM, Cláudio Dias. Resistência de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos a antimicrobianos, **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v.8, n.4, p. 120 – 131, 2014.

STERZO, Vinicius. et al. Salmoneloses aviárias. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 129-138, 2008.

TORPDAHL, Mia. et al. Detection of *qnr* genes in *Salmonella* isolated from humans in Denmark. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 406-408, 2009.

VÁZQUEZ, Elisa García.; TORRES, Alicia Hernández.; MARTÍNEZ, José Antonio Herrero.; GÓMEZ, Joaquín Gómez. Infecciones por *Salmonella* y *Yersinia*. **Medicine (Spain)**, v. 11, n. 56, p. 3322–3326, 2014

VELDMAN, Kess.; PELT, Wilfrid Van.; MEVIUS, Dik First report of *qnr* genes in *Salmonella* in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 452-453, 2008.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Salmonella**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>.

ANEXO 1. Antibiograma das bactérias *Salmonella enterica* isoladas das amostras de carnes de frango

Antibióticos	Cepas isoladas (halo de inibição medido em mm)												
	26 E3	21 EA2	23 EA2	29 AE3	5 LA1	15LA2.1	16 LA3	LA 1.2	LA2.1	LA 4.2.1	LA 4.2.2	LA 4.2.3	LA 5.0.1
SUL	SH	18	SH	20	SH	SH	27	SH	16	SH	SH	15	16
CLO	26	26	21	21	20	26	29	25	25	35	15	10	30
CTX	22	21	30	29	29	34	25	41	29	41	38	18	39
TET	11	SH	24	23	SH	15	24	14	23	SH	SH	SH	13
IMP	20	22	13	15	19	21	19	18	19	31	31	21	19
GEN	19	15	19	20	15	19	19	11	18	30	29	20	14
AMC	SH	SH	SH	SH	SH	SH	SH	16	SH	SH	SH	SH	10
CIP	31	28	23	23	34	21	20	21	17	40	47	33	21
CAZ	26	25	21	28	25	26	25	28	28	39	37	28	29
	LA5.0.2	LA5.2.1	LA5.2.2	LA5.2.3	LA7.1	LA 7.2	LA 9.2.1	LA 7.2.2	LA8.1	LA 8.1.1	LA 9	LA 9.1	
SUL	26	SH	37	SH	24	19	15	20	21	12	15	SH	
CLO	30	18	35	32	26	23	28	22	24	22	28	25	
CTX	31	36	33	40	27	31	24	25	15	25	27	30	
TET	25	SH	35	SH	26	17	-	11	24	26	26	29	
IMP	19	26	35	25	25	20	21	21	25	20	23	20	
GEN	22	24	28	25	15	16	15	17	20	16	15	16	
AMC	SH	SH	28	SH	10	SH	SH	SH	10	SH	9	SH	
CIP	23	38	30	37	30	31	31	28	33	25	26	29	
CAZ	28	36	29	32	26	21	25	22	19	21	24	25	

SH = sem halo de inibição; SUL = sulfonamida, CLO = cloranfenicol, CTX = cefotaxima, TET = tetraciclina, IMP = imipenem, GEN = gentamicina, AMC = amoxicilina com ácido clavulânico, CIP = ciprofloxacina, CAZ = ceftazidima.

ANEXO 2. NORMAS DE SUBMISSÃO PARA A REVISTA HIGIENE ALIMENTAR

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, revisões bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do programa*; gráficos em *Winword, Power Point ou Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw nas mais variadas versões do programa* (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *Photo Shop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. Do trabalho deverão constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Resultados de pesquisas relacionados a seres humanos deverão ser apresentados acompanhados do número do parecer junto ao Comitê de Ética da instituição de origem ou outro relacionado ao Conselho Nacional de Saúde.

05. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e co-autores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições às quais pertencem, com três níveis hierárquicos (Universidade, Faculdade, Departamento), também a cidade, estado e país.

06. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.

07. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).

08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados

09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.

10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.

11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e co-autores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.

12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail autores@higienealimentar.com.br.

13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada **declaração de recebimento** ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-mail autores@higienealimentar.com.br

14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via e-mail.

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista. Neste caso, por ocasião da publicação, será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diagramada. Não havendo autor assinante, a taxa de publicação será de R\$ 70,00 por página diagramada.

17. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do *e-mail*

autores@higienealimentar.com.br