

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

***Salmonella* spp na cadeia de produção de carne bovina de exportação:
ocorrência, perfil de susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência e
perfil de macrorrestrição por PFGE**

Janaina Thais Lopes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

SÃO PAULO
2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

***Salmonella* spp na cadeia de produção de carne bovina de exportação:
ocorrência, perfil de susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência e
perfil de macrorrestrição por PFGE**

Janaina Thais Lopes

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

SÃO PAULO
2011

Janaina Thais Lopes

Salmonella spp na cadeia de produção de carne bovina de exportação: ocorrência, perfil de susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência e perfil de macrorrestrição por PFGE

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

1°. Examinador

2°. examinador

São Paulo, _____ de 2011.

Dedico este trabalho aos meus amigos e amados pais Roberto e Eliana e ao meu noivo Carlos Eduardo os quais batalharam junto comigo para a realização desse sonho.

Agradeço...

...A DEUS por me dar coragem para não desistir de um sonho, sabedoria para planeja-lo, paz para não perde-lo, dignidade para encara-lo e muita força para concretiza-lo.

... Aos meus pais Roberto e Eliana, ao meu irmão Flávio e a minha cunhada Lillian, por serem pessoas maravilhosas e me ensinarem que a vida é cheia de obstáculos, mas que juntos conseguimos ultrapassa-los, e nos tornarmos pessoas ainda mais maravilhosas, por todo amor e carinho, pela confiança e pela oportunidade de crescer.

... Ao meu querido noivo Carlos Eduardo (Du) pelo apoio, pela paciência, pelo incentivo, pelos conselhos e por todo carinho que me fizeram encarar a vida de uma maneira melhor.

NEOQEAV!

... A minha grande família, meus avós maternos João Peixoto e Creuza, meus avós paternos (In Memoriam) Indalécio e Dorotheia (vó Lola, eternamente amada), aos meus tios, tias, primos, primas, amo muito todos vocês.

... A família do Du que também é minha família, pelo carinho, pelo amor e respeito que nós conquistamos.

... A minha querida Orientadora Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco, pela oportunidade, orientação, amizade, confiança e ensinamentos.

... As Profa. Dra. Maria Teresa Destro e Mariza Landgraf, pelos ensinamentos, convívio e amizade.

... Aos meus verdadeiros amigos e companheiros de trabalhos e muitas risadas, Graciela, Maria Cristina, Matheus, Priscila (amizade além da vida) e Rita, por todos os momentos que passamos juntos neste anos.

... Aos amigos Adriana, Anderson, Carol, Danielle, Eb, Joyce, Kátia Leani, Lúcia, Máira, Maria Fernanda, Marina, Mônica, Patrícia, Priscila, Verena, Verônica e Vinícius, pela amizade e colaboração.

... A Mônica, Cleonice e Edílson da secretaria do departamento, pelos serviços prestados.

... A Elaine e Jorge da secretaria de Pós- Graduação, pela atenção e pelos serviços prestados.

... Aos funcionários do frigorífico, onde foram realizadas as coletas das amostras deste trabalho.

... Ao Instituto Oswaldo Cruz, pelo trabalho prestado.

Meus sinceros agradecimentos...

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE QUADRO.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
1. INTRODUÇÃO.....	2
2. REVISÃO DA LITEIRATURA.....	5
2.1 Carne bovina no Brasil.....	5
2.2 Risco Microbiológico em alimentos.....	6
2.3 Microbiologia da carne bovina.....	7
2.4 <i>Salmonella</i> spp.....	8
2.4.1 Características gerais.....	8
2.4.2 Epidemiologia das salmoneloses.....	10
2.4.3 Patogenicidade e Fatores de Virulência.....	12
2.4.4 Susceptibilidade antimicrobiana.....	15
2.4.5 Tipagem Molecular – Perfil de macrorrestrição.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Amostragem.....	22
4.2 Coleta das amostras.....	23
4.3 Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.....	24
4.4 Confirmação da identificação de <i>Salmonella</i> spp por PCR.....	27

4.4.1	Obtenção do DNA teste.....	27
4.4.2	Reação da PCR.....	27
4.4.3	Análise do produto amplificado.....	28
4.5	Sorotipagem Completa.....	28
4.6	Enumeração de <i>Salmonella</i> spp.....	28
4.7	Pesquisa dos genes de virulência.....	28
4.7.1	Análise do produto amplificado.....	29
4.8	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana.....	30
4.9	Perfil de macrorrestrição por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).....	30
4.9.1	Preparo da suspensão celular.....	30
4.9.2	Preparo dos blocos de agarose.....	31
4.9.3	Lise celular e lavagens.....	31
4.9.4	Reação de Restrição.....	31
4.9.5	Eletroforese.....	32
4.9.6	Análise dos resultados.....	32
5.	RESULTADOS.....	34
5.1	Positividade para <i>Salmonella</i> spp.....	34
5.2	Genes de virulência nos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	41
5.3	Perfil de susceptibilidade antimicrobiana.....	42
5.4	Perfil de macrorrestrição por PFGE.....	47
5.5	Correlação dos resultados obtidos.....	47
5.6	Enumeração de <i>Salmonella</i> spp.....	52
6.	DISCUSSÃO.....	54
7.	CONCLUSÕES.....	61
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema do abate de bovinos e processamento de carne bovina, com indicações dos pontos de coleta do presente estudo.....	23
Figura 2. Pontos de coleta das carcaças bovinas das regiões onde amostras superficiais de 400 cm ² foram coletadas.....	24
Figura 3. Esquema da metodologia de pesquisa de <i>Salmonella</i> spp nas amostras de couro e carcaças bovinas.....	26
Figura 4. Positividade para <i>Salmonella</i> spp no couro (CO) dos animais estudados e nas carcaças após a esfola (CA1) e após a lavagem, antes da refrigeração (CA2).....	34
Figura 5. Distribuição de amostras positivas para <i>Salmonella</i> spp, de acordo com o ponto da linha de abate amostrado e mês de coleta das amostras.....	37
Figura 6. Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos com fitas M.I.C Evaluator™	43
Figura 7. Dendograma indicando a relação genética entre os isolados de <i>Salmonella</i> spp obtidos no couro (CO), carcaça 1 (CA1) e carcaça 2 (CA2) dos animais amostrados.....	48

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na reação de PCR para confirmação dos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	27
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> utilizados na pesquisa dos genes de virulência nos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	29
Tabela 3. Características dos isolados de <i>Salmonella</i> spp de acordo com a procedência dos animais, tipo de criação, ponto amostrado e sorovar encontrado.....	39
Tabela 4. Positividade dos isolados de <i>Salmonella</i> spp aos genes de virulência estudados.....	41
Tabela 5. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	44
Tabela 6. Características dos isolados de <i>Salmonella</i> spp de acordo com a data de coleta, a procedência do animal, o tipo de criação, o sorovar encontrado e o perfil de macrorrestrição.....	49

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Positividade para <i>Salmonella</i> spp nas amostras bovinas de acordo com a data da coleta das amostras, a origem do lote do animal (fazenda / Estado) e o ponto amostrado.....	35

LOPES, J.T. ***Salmonella* spp na cadeia de produção de carne bovina de exportação: ocorrência, perfil de susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência e perfil de macrorrestrição por PFGE.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RESUMO

A carne está exposta à contaminações em todas as fases do seu processamento tecnológico, particularmente nas operações em que é mais manipulada e sempre que não são tomados cuidados especiais em relação às Boas Práticas de Higiene. O patógeno mais importante em carne bovina é *Salmonella* spp, o principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos no mundo. Vários estudos têm relatado a ocorrência de *Salmonella* spp em carne bovina *in natura* disponível no mercado, mas pouco se sabe sobre este patógeno em carne bovina produzida no Brasil para exportação. O presente estudo objetivou verificar a prevalência, o perfil de susceptibilidade antimicrobiana, a presença de genes de virulência e o perfil de macrorrestrição por PFGE em cepas de *Salmonella* spp isoladas em diferentes pontos da cadeia de produção. A pesquisa foi realizada em um abatedouro de grande porte que produz carne bovina para exportação. Amostras de superfície foram coletadas de 200 animais, em três pontos do processo do abate: no couro (CO), na carcaça após a esfolagem (CA1) e na carcaça após a lavagem, antes da refrigeração (CA2), com um total de 600 amostras. A metodologia utilizada para detecção de *Salmonella* spp foi a preconizada pela ISO 6579:2002, confirmando-se os resultados de identificação pela técnica de PCR e sorotipagem completa. O patógeno foi encontrado no CO de 31 animais (15,5%), na CA1 de 7 animais (3,5%) e na CA2 de 6 animais (3%). Houve a prevalência do sorovar *S. Infantis* (54,5%), seguido de *S. Enteritidis* (13,6%). Pesquisou-se a presença dos genes de virulência *invA*, *sitC*, *spaN*, *sifA* e *msgA* por PCR nos isolados de *Salmonella* spp de cada ponto amostrado positivo, em um total de 44 isolados. Observou-se que 59,1% dos isolados apresentaram todos os genes pesquisados e que os demais apresentaram pelo menos dois dos cinco genes de virulência estudados. Os mesmos isolados foram analisados quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos, empregando-se as fitas M.I.C Evaluator (Oxoid) com os antimicrobianos ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem e tetraciclina. Dos 44 isolados estudados, todos foram sensíveis a cefotaxima, ciprofloxacina, gentamicina e imipenem, enquanto que 5 (11,4%) foram resistentes à ampicilina e à tetraciclina simultaneamente. O perfil de macrorrestrição, feito por PFGE, mostrou que os isolados expressaram 26 perfis genéticos distintos, sendo que maioria dos perfis (92,3%) foi constituída por apenas um ou dois isolados. Os resultados indicam que *Salmonella* spp está presente no abatedouro estudado. A ocorrência de isolados pertencentes ao mesmo sorovar e ao mesmo perfil de macrorrestrição no couro de animais e também nas carcaças CA1 e CA2 indica possível contaminação cruzada durante o processo de abate, reforçando a necessidade da adoção de Boas Práticas de Higiene para evitar a disseminação do patógeno na cadeia de produção da carne bovina.

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

LOPES, JT ***Salmonella* spp in export beef production chain: occurrence, antimicrobial susceptibility, virulence genes and PFGE macrorestriction profiles.** 2011. Dissertation (Masters Degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2011.

ABSTRACT

Beef is exposed to contamination at all stages of the production chain, particularly in operations where it is more manipulated and when Good Hygiene Practices are not properly followed. The most relevant pathogen in bovine meat is *Salmonella* spp, the major causative agent of foodborne diseases in the world. Several studies have shown that *Salmonella* spp can occur in raw bovine meat at retail level, but little is known about this pathogen in meat produced for export. The present study aimed to determinate the prevalence, antimicrobial susceptibility test, the presence of virulence genes and PFGE macrorestriction profiles of *Salmonella* spp isolates obtained at different points of the production chain. The survey was conducted in a large slaughterhouse that produces bovine meat for export. Surface samples were collected from 200 animals, at three points of the slaughtering process: hide right (CO), carcass after removal of the hide (CA1) and carcass after cleaning but before chilling (CA2), with a total of 600 samples. The methodology used for detection of *Salmonella* spp was that recommended by ISO 6579:2002, and results were confirmed by PCR and complete serotyping. The pathogen was found in CO of 31 animals (15.5%), in CA1 of 7 animals (3.5%) and CA2 of 6 animals (3%). The prevalent serovar was S. Infantis (54.5%), followed by S. Enteritidis (13.6%). The presence of virulence genes *invA*, *sitC*, *spaN*, *sifA* and *msgA* was investigated by PCR in 44 isolates. All these genes were detected in 59.1% of the isolates, and the others had at least two of these virulence genes. The same isolates were tested for antimicrobial susceptibility using the MIC Evaluator strips (Oxoid) with the antimicrobials ampicillin, cefotaxime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem and tetracycline. All 44 isolates were sensitive to cefotaxime, ciprofloxacin, gentamicin and imipenem, whereas five (11.4%) were resistant to ampicillin and tetracycline simultaneously. The macrorestriction profiles, determined by PFGE, the 44 isolates expressed 26 different genetic profiles, and most profiles (92.3%) contained only one or two isolates. The results indicate that *Salmonella* spp is present in the studied abattoir. The occurrence of isolates belonging to the same serovar and presenting the same macrorestriction profile in the hides and in the carcasses indicates possible cross contamination during the slaughtering process, strengthening the need of adoption of Good Hygiene Practices to avoid dissemination of the pathogen in beef the production chain.

Keywords: *Salmonella* spp, beef, production chain, virulence genes, antimicrobial susceptibility, PFGE.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte representa a maior fatia do agronegócio brasileiro, gerando faturamento de mais de R\$ 50 bilhões/ano e cerca de 7,5 milhões de empregos (ABIEC, 2011a). De 2005 a 2009, o Brasil foi o segundo maior produtor de carne bovina, perdendo apenas para os Estados Unidos e liderou o ranking dos países exportadores mundiais de carne bovina, tendo em 2007 também a maior taxa de exportação de carne bovina com 2.534 milhões de toneladas, seguido da Austrália e a Índia e apresentou a sua maior produção de carne bovina com 9.297 milhões de toneladas (ABIEC, 2011b).

A extensão territorial, as condições climáticas e os programas voltados para a sanidade animal e segurança do alimento posicionam o Brasil como um dos maiores produtores de carne bovina com potencial para atender quaisquer exigências de mercado (ABIEC, 2011c). O Brasil em 2009 tinha um rebanho bovino de 193 milhões de cabeças, sendo o maior rebanho comercial do mundo. A produção nacional de carne bovina está crescendo a taxas maiores do que no passado em decorrência do aumento da produtividade. Com um custo de produção dentre os mais baixos do mundo, o que traz uma grande vantagem competitiva (ABIEC, 2011a; ABIEC, 2011d). No período de 1994 a 2006, a produção teve um incremento de 73,1%. Mesmo sendo o maior exportador de carne bovina do mundo, o Brasil não consegue atender alguns mercados, pelo fato de a pecuária nacional não ser totalmente livre de febre aftosa, a principal barreira sanitária para a carne bovina brasileira (SOFOS, 2008).

Devido suas características intrínsecas, a carne é um excelente substrato para a multiplicação de inúmeros microrganismos, sendo muitos os fatores que podem favorecer esse desenvolvimento microbiano. A carne está exposta às contaminações de natureza microbiana em todas as fases do seu processamento tecnológico, particularmente nas operações em que é mais manipulada e sempre que não são tomados cuidados especiais em relação às Boas Práticas de Higiene. (HOBBS e ROBERTS, 1999; PARDI et al., 2001; SOFOS et al., 2008).

Salmonella spp é, certamente, o microrganismo patogênico de maior relevância em alimentos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, a salmonelose figura como uma das mais importantes enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) devido ao número de pessoas afetadas, complicações e sequelas da doença, além do prejuízo econômico com tratamentos médicos e hospitalares e reprocessamento ou destruição de alimentos (JAY, 2005). A preocupação com este patógeno é ainda maior quando se verifica o surgimento e disseminação de cepas multi-resistentes e potencialmente mais patogênicas (SKOV et al., 2007; GRAZIANI et al., 2008).

A escassez de dados sobre a prevalência de microrganismos patogênicos na carne bovina produzida no Brasil impacta o comércio internacional, deixando o país em desvantagem em relação a outros grandes produtores, como Estados Unidos e Austrália. Em uma época em que os perigos microbiológicos nos alimentos que transitam entre diferentes países são avaliados e monitorados com base na Avaliação de Riscos, conforme determinado pelo Acordo Sanitário e Fitossanitário estabelecido entre países signatários da Organização Mundial do Comércio, é premente a necessidade de ampliar os dados sobre microrganismos patogênicos na carne bovina brasileira. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de preencher esta lacuna e contribuir com dados sobre *Salmonella* spp em carne bovina brasileira destinada à exportação.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carne bovina no Brasil

A partir dos anos 50, com a modernização das indústrias brasileiras, os frigoríficos passaram a adotar novas formas de trabalho, trazendo um importante impacto para o setor e impulsionando a modernização dos abatedouros e das indústrias de carnes. Essas mudanças, promovidas com incentivos nacionais e internacionais, resultaram na abertura de novos frigoríficos, com capital nacional majoritário, e que somados às empresas já existentes ampliaram a quantidade de carne ofertada no mercado interno e também aquela destinada ao mercado exterior (MIRANDA e MOTTA, 2001).

A intensificação das relações comerciais, o aumento da renda e o crescimento da população mundial têm estimulado a competitividade entre os países exportadores de alimentos. Nesse cenário, o Brasil consolidou-se como o principal produtor e exportador de proteína de origem animal, e em 2008 foi o maior exportador mundial de carne bovina e de aves e o 4º maior exportador mundial de carne suína, atingindo a marca histórica de US\$ 11 bilhões em exportações de carnes (MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR, 2008).

Em 2010, o Brasil exportou cerca de 1.230 bilhões toneladas de carne *in natura*, sendo a Rússia o maior comprador, seguida de Irã, Egito, Hong Kong, Venezuela, Itália, Arábia Saudita, Argélia, Israel, Líbano, Chile e Países Baixos (ABIEC, 2010).

O consumo de carne bovina como fonte de proteína animal é um hábito consolidado no Brasil e vem aumentando cada vez mais. Em 2005, o consumo de carne bovina era de 6.795 milhões de toneladas, apresentando um aumento a cada ano chegando a 7.445 milhões de toneladas em 2010. O Brasil é o quarto maior consumidor per capita de carne bovina, com consumo médio de 37 quilos por pessoa/ano nos últimos 15 anos, atrás dos Estados Unidos, Argentina e Uruguai (ABIEC, 2011b).

2.2 Risco Microbiológico em alimentos

Durante décadas, os riscos associados ao consumo de alimentos contendo microrganismos patogênicos eram avaliados exclusivamente através da conformidade com padrões e critérios microbiológicos pré-estabelecidos. No entanto, resultado de análises laboratoriais de alimentos é uma ferramenta muito limitada para assegurar sua segurança, principalmente quando o índice de contaminação é baixo. Portanto, é necessário que os produtores de alimentos tenham uma ação pró-ativa, utilizando ferramentas eficientes no controle dos microrganismos, como as Boas Práticas de Higiene e o sistema APPCC. No entanto, mesmo quando estas ferramentas são utilizadas, é difícil correlacionar os impactos da contaminação microbiológica à saúde pública, principalmente em países onde os dados epidemiológicos sobre as enfermidades de origem alimentar são precários (REIJ e SCHOTHORST, 2000).

Para solucionar esse impasse, em 1994 os países membros da Organização Mundial do Comércio (OMC) assinaram um Acordo de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias, cuja principal consequência foi a compreensão da necessidade de aplicação de uma nova ferramenta para se avaliar o impacto dos microrganismos contaminantes de alimentos na saúde da população, chamada Análise de Risco. Segundo o Acordo, o Codex Alimentarius seria o fórum encarregado de fornecer os subsídios técnico-científicos necessários para que as avaliações de riscos assegurem práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos (CODEX ALIMENTARIUS, 1999).

No entanto, na maioria dos países, inclusive o Brasil, avaliações de risco são difíceis de serem realizadas devido às inúmeras lacunas, com destaque para a fragilidade dos dados epidemiológicos sobre a prevalência e características das enfermidades associadas aos alimentos no país. Para que o Brasil possa ter uma participação mais efetiva nas discussões nos diferentes Comitês Internacionais do Codex Alimentarius, principalmente nos relativos às Análises de Riscos Microbiológicos, as lacunas existentes precisam ser preenchidas.

2.3 Microbiologia da carne bovina

Nenhum alimento está totalmente isento de microrganismos, a não ser que tenha sido esterilizado, como é o caso de enlatados ou fórmulas especiais para crianças ou pacientes imunodeprimidos. Alimentos crus de origem animal estão naturalmente contaminados com microrganismos, alguns das quais podem causar doença no homem caso o alimento não seja apropriadamente tratado antes de seu consumo (FRANCO et al., 2010).

Na cadeia de produção da carne bovina, a esfolagem, a evisceração e o resfriamento compreendem os principais pontos críticos de contaminação microbiana a serem controlados. A esfolagem é uma das etapas mais críticas, pois a superfície da pele, pêlos, patas e úberes dos animais estão impregnados de sujidades podendo veicular grande quantidade de microrganismos para a superfície da carcaça. O trato gastrointestinal dos animais é outra fonte importante de microrganismos, assim a evisceração deve ser conduzida cuidadosamente, evitando que os microrganismos do intestino atinjam a carcaça. Para isso, medidas preventivas durante o abate, como por exemplo, a oclusão do reto e esôfago, são imprescindíveis (PARDI et al., 2001).

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

A importância desses patógenos para a carne bovina varia de acordo com o patógeno, o país e o período considerado. Em relação à *Salmonella* spp, na União Européia, a presença do patógeno nas carcaças bovinas nos abatedouros de países no qual o monitoramento é realizado é considerada baixa, variando de <0,1% a 0,6% (EFSA, 2005). Nos Estados Unidos, de acordo com o *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) do Departamento de Agricultura, no período de 1998 a 2003, *Salmonella* spp foi detectada em 1,9% das carcaças de bovinos (242 amostras positivas em 12.884 testadas), 0,4% das carcaças de vitelo (50 positivas em 12.835 testadas), e 2,8% das amostras de carne moída (3.839 positivas em 134.788 testadas) (WHITE et al., 2007).

2.4 *Salmonella* spp

2.4.1 Características gerais

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e as bactérias pertencentes a este grupo apresentam as seguintes características: forma de bastonete reto, medindo cerca de 0,7-1,5 x 2,5mm; Gram negativo; ausência de esporos; anaeróbia facultativa; geralmente móveis por flagelos peritríquios; e o metabolismo da glicose e de outros carboidratos resulta na produção de ácido e geralmente gás. As salmonelas são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono, não produzem oxidase, produzem catalase, não produzem indol, não são produtores de acetoina, produzem H₂S, não hidrolisam uréia, mas descarboxilam lisina e ornitina (DOYLE et al., 2001; D'AOUST e MAURER, 2007).

As salmonelas são mesófilas, sendo 35° C a 40° C a temperatura ótima para o seu desenvolvimento. No entanto, alguns sorovares são capazes de se multiplicar em temperaturas mais elevadas ($\leq 54^{\circ}$ C), enquanto outros têm propriedades psicotróficas, podendo se multiplicar em temperaturas de refrigeração de 2° C a 4° C. São sensíveis ao calor e geralmente são destruídas pelo aquecimento a 60° C, por 15-20 minutos. O congelamento provoca uma redução significativa do número de células viáveis, mas não a destruição completa. Apresentam um pH ótimo de multiplicação entre 6,5 e 7,5. (D'AOUST e MAURER, 2007; FERREIRA e CAMPOS, 2008; BAILEY et al., 2010).

A atividade de água (A_w) afeta a multiplicação deste patógeno, com um limite mínimo de 0,94. No entanto as salmonelas podem sobreviver por mais de um ano em alimentos com baixa A_w , como chocolate, pimenta do reino, manteiga de amendoim e gelatina em pó (JAY, 2005; GERMANO e GERMANO, 2003).

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a espécie *S. enterica* contém seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *Houtenae* e *S. enterica* subsp. *Indica*. Em 2004, foi proposta a inclusão de uma terceira espécie denominada *S. subterranea*, isolada de sedimento da região aquífera de Oak Ridge, Estados Unidos. Como esta espécie apresenta 96,4% de

similaridade com *S. bongori*, não há um consenso se é uma nova espécie ou não (BAILEY et al., 2010).

O gênero *Salmonella* spp contém muitos sorovares de acordo com os antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) presentes. São conhecidos atualmente 2.450 sorovares diferentes, dos quais o maior número está na espécie *S. enterica* subsp. *enterica* (POPOFF e LE MINOR, 2005; FERREIRA E CAMPOS, 2008; BAILEY et al., 2010).

Em relação à grafia do gênero, espécie, sub-espécie e sorovar, considera-se internacionalmente aceito o esquema proposto pelo CDC dos Estados Unidos, no qual o gênero, a espécie e a subespécie são escritos em letras itálicas e o sorovar em letras romanas, por exemplo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis. Por conveniência, costuma-se citar apenas o gênero e o sorovar, grafando-se, por exemplo, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, etc (CDC, 2002).

Embora todos os sorovares de *Salmonella* spp devam ser considerados como microrganismos patogênicos, apenas um número limitado deles é responsável por infecção em humanos e animais. A maioria dos sorovares de *Salmonella* responsáveis pelas enfermidades pertence à espécie *S. enterica* subsp. *enterica* (TAVECHIO et al., 2002).

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

A) **Febre tifóide**: doença bacteriana aguda, de gravidade variável, causada por *S. Typhi*, sendo transmitida por água e alimentos contaminados com o patógeno. Em geral, os sintomas aparecem até 14 dias após a ingestão do patógeno e são caracterizados por septicemia, febre alta, diarreia, vômitos, letargia, dor abdominal, cefaléia e erupções cutâneas, com duração de uma a oito semanas e taxa de letalidade em torno de 10%. Alguns indivíduos podem se tornar portadores, excretando a bactéria durante meses;

B) **Febre paratifóide**: causada por *S. Paratyphi* A e C. A doença é semelhante à febre tifóide, mas com sintomas mais brandos. Geralmente ocorre septicemia, febre, vômitos e diarreia, com duração máxima de três semanas;

C) **Salmonelose** (gastroenterite ou enterocolite): representa a forma clínica mais comum e tem como agentes etiológicos os sorovares não tifóides e ubíquos. Os sintomas aparecem em 12 a 36 horas após o consumo de alimentos contaminados e caracterizam-se por febre, cefaléia, calafrios, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômito. No entanto, em alguns casos a diarreia pode ser muito severa e necessite a hospitalização do paciente. Em casos raros, a infecção por *Salmonella* pode resultar em condições crônicas como artrites e Síndrome de Reiter (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005; BAILEY et al., 2010).

A simples presença de *Salmonella* spp no alimento não é suficiente para causar a doença no homem, sendo necessária que sua concentração seja superior à dose infectante, que depende da virulência do sorovar envolvido e dos fatores ligados ao hospedeiro, como espécie, raça, idade e condições imunológicas e nutricionais. A dose infectante capaz de causar doença pode ser de apenas uma célula, como ocorre com *S. Typhi*, ou de milhões de células, como por exemplo, 10^5 a 10^6 para *S. Bareilly* e *S. Newport* e 10^9 a 10^{10} para *S. Pullorum* (JAY, 2005; FDA; CFSAN, 2008).

2.4.2 Epidemiologia das salmoneloses

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).

Há uma grande variação na ocorrência de *Salmonella* spp em produtos cárneos brasileiros. Estudos realizados em diferentes regiões do país mostraram frequências entre 6% e 50% em carcaças de frango (SANTOS et al., 2000; FUZIHARA et al., 2000; VESSONI, 2004; CARVALHO e CORTEZ, 2005; TIROLLI e COSTA, 2006; RISTORI et al., 2008); entre 10,48% e 39,3% em cortes comerciais

de frango (COSTA, 1996; BAÚ et al., 2001; CARVALHO e CORTEZ, 2005; RIBEIRO et al., 2007); entre 7,5% e 24,8% em lingüiças (CORTEZ, 2003; CARVALHO e CORTEZ, 2005; SPRICIGO et al., 2008; MÜRMAN et al., 2009); entre 3,24% e 6% em salsichas de frango (LUIZ et al., 2004; MARTINS et al., 2008) e 25% em carne de aves mecanicamente separada (CARVALHO e CORTEZ, 2005).

Salmonella spp é um dos patógenos mais frequentemente associados às doenças de origem alimentar em inúmeros países, como Áustria (MUCH et al., 2009); Brasil (JAKABI et al., 1999; TAVECHIO et al., 2002; GEIMBA et al., 2004; NADVORNY et al., 2004; VAN AMSON et al., 2006); Estados Unidos (GERNER-SMIDT e WHICHARD, 2007); Espanha (DOMÍNGUEZ et al., 2007); Inglaterra e Gales (HUGHES et al., 2007); Japão (KUBOTTA et al., 2008) e outros.

Em países em que o sistema de notificação e investigação de surtos de doenças está implementado e consolidado, a real dimensão do problema das salmoneloses de origem alimentar ainda é desconhecida. Nos países desenvolvidos calcula-se que por ano, mais de 30% da população seja afetada por alguma enfermidade desta natureza (CVE, 2004).

Nos Estados Unidos, segundo o CDC (2011) no período de 2006 a início de 2011 ocorreram 21 surtos causados por *Salmonella* spp veiculada por alimentos de natureza conhecida. Em 2006, o alimento relacionado foi o tomate e o sorovar encontrado foi *S. Typhimurium*. Em 2007, os alimentos e os sorovares envolvidos foram manteiga de amendoim (*S. Tennessee*), snack à base de vegetais (*S. Wandsworth*), ração para animais (*S. Schwarzengrund*) e torta servida em um banquete (*S. I 4,[5],12:i:-*). Em 2008, foram melões cantaloupes (*S. Litchfield*), cereais e trigo (*S. Agona*) e pimentas Jalapeño (*S. Saintpaul*). Em 2009, foram manteiga de amendoim (*S. Typhimurium*), pistache (múltiplos sorovares) e alfalfa (*S. Saintpaul*). Em 2010, foi água contaminada de tanques de peixes (*S. Typhimurium*), pimenta vermelha e preta (*S. Montevideo*), alfalfa (*S. Newport*), roedores congelados utilizados na alimentação dos répteis (*S. I 4,[5],12:i:-*), comida de um restaurante *fast food* mexicano (*S. Hartford* e *S. Baildon*), polpa de fruta congelada (*S. Typhi*), arroz com frango congelado (*S. Chester*), ovos (*S. Enteritidis*) e alfalfa (*S. I 4,[5],12:i:-*). Em março de 2011, iniciou-se um surto de salmonelose associado a melões

cantaloupes, causado por *S. Panama*. Segundo o CDC, aproximadamente 40 mil casos de salmoneloses são reportados no país a cada ano e os sorovares mais comumente encontrados nas infecções humanas são *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. (CDC, 2011).

No Brasil, segundo dados da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, no período de 1999 a 2010 ocorreram 6.791 surtos de doenças transmitidas por alimentos, envolvendo 133.954 pessoas. Dos surtos em que foi possível determinar o microrganismo envolvido, verificou-se que 45,9% foram causados por *Salmonella* spp. As carnes vermelhas foram responsáveis por 11,6% dos surtos de origem alimentar ocorridos no Brasil neste período (SVS, 2010). Esses números certamente não refletem a realidade, pois no Brasil, assim como em outros países, pouco se conhece sobre a magnitude do problema, visto que muitos surtos não são notificados. (CVE, 2004; EDUARDO et al., 2004; SVS, 2005). No Estado de São Paulo, o sorovar isolado com maior frequência em amostras clínicas é *S. Enteritidis*, seguido dos sorovares *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Typhi* e *S. enterica* subsp. *enterica* 4,[5],12:i:- (FERNANDES et al., 2006). Em alimentos, o sorovar mais frequentemente isolado também é *S. Enteritidis* (TAVECHIO et al., 1996; TAVECHIO et al., 2002; MÜRMAN et al., 2009).

Na União Européia, a *European Food Safety Authority* reportou que, no período entre 2001 e 2005, ocorreram 5.355 surtos de doenças de origem alimentar, dos quais 3.406 (63,6%) foram causados por *Salmonella* spp. Esses surtos envolveram 25.760 indivíduos, dos quais 3.354 foram hospitalizados e 16 morreram (EFSA, 2005). Em 2009 ocorreram 108.614 surtos de salmoneloses, com uma diminuição de 17,8% em relação ao número de surtos ocorridos em 2008 (EFSA, 2011). Os sorovares predominantes encontrados nesta região foram *S. Enteritidis* e *S. Choleraesuis* (CHIU et al., 2004; FOLEY e LYNNE, 2008; GREIG e RAVEL, 2009).

2.4.3 Patogenicidade e Fatores de Virulência

As salmonelas entram no hospedeiro via rota fecal-oral, e são capazes de sobreviver no estômago apesar do baixo pH e de colonizar o epitélio intestinal. Normalmente, o quadro diarréico resultante é moderado, sem a presença de sangue nas fezes. Entretanto, em alguns casos, o volume de fezes eliminadas pode ser pequeno, podendo conter sangue e ocorrer tenesmo. O transporte através do retículo-endotelial e a capacidade de multiplicação do patógeno no interior dos macrófagos possibilitam sua disseminação no organismo. Na maioria dos casos, a doença é autolimitada, mas o tratamento com antimicrobianos pode ser necessário em casos mais graves (PARDI et al., 2001; D'AOUST e MAURER, 2007; FERREIRA e CAMPOS, 2008; FOLEY e LYNNE, 2008).

Um dos processos mais importantes na patogenicidade de *Salmonella* spp é a invasão de células do epitélio intestinal, que é um fator essencial de virulência no processo de infecção. As bases moleculares desta invasão são complexas e muitos genes estão envolvidos neste processo. Sabe-se que a maioria dos genes de virulência localiza-se em regiões específicas do cromossomo bacteriano, denominadas ilhas de patogenicidade (Salmonella Pathogenicity Islands – SPI). Já foram descritas doze SPI diferentes. Esses genes estão associados à capacidade de invasão da célula hospedeira e a patogênese intracelular. Acredita-se que esses genes tenham sido adquiridos de outras espécies bacterianas por transferência genética horizontal (VAN ASTEN e VAN DIJK, 2005; PLYM-FORSHELL, 2006; D'AOUST e MAURER, 2007). As SPI são formadas por sequências de DNA que codificam determinantes de virulência responsáveis por estabelecer interações específicas com o hospedeiro (MARCUS et al., 2000).

Sabe-se que a SPI-1 contem os genes que codificam o sistema de secreção tipo III constituído por um complexo de proteínas responsáveis pela adesão e invasão da célula hospedeira, assim como genes relacionados com a produção de toxinas (HACKER et al., 1997; COBURN et al., 2007). 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, 2000). As outras SPI foram relatadas em *S. Typhi* e

estão relacionadas com a codificação de fímbrias, resistência a bacteriocinas e produção de toxinas (PARKHILL et al., 2001).

Entre os genes presentes na região SPI-1 está o *invA*, caracterizado por Gálan e Curtiss (1989) e identificado como primeiro de um operon de genes (*invABCDEFGH*) responsáveis pela produção de proteínas envolvidas no processo de invasão das células epiteliais, sendo considerado um componente essencial para a patogênese da doença. O operon de genes *inv* está presente na maioria das cepas de *Salmonella* e é considerado importante na identificação do gênero (MARCUS et al., 2000; WALLIS e GALYOV, 2000; SANTOS, 2001).

Gálan e Ginocchio (1992) verificaram que a presença do gene *invA* em *Salmonella* Typhimurium foi responsável pela capacidade de invasão em células epiteliais. Os autores concluíram que ele foi essencial para a invasão, pois mutantes deste gene foram deficientes na invasão de células epiteliais.

Rahn et al. (1992) verificaram que o gene *invA* pode ser usado em reação de PCR para diferenciar *Salmonella* spp de outros microrganismos, pois este gene estava presente em todas as 630 cepas de *Salmonella* pertencentes a 100 sorotipos diferentes, com exceção de duas cepas de *S. Litchfield* e duas de *S. Sentfenberg*.

O gene *invA* é necessário para que ocorra a invasão das células M no epitélio intestinal que possuem um papel fundamental na patogenicidade de *Salmonella* nos primeiros estágios da infecção (CLARK et al., 1998). Esta necessidade foi demonstrada também em estudos realizados em intestino de camundongos (PENHEITER et al., 1997).

A patogênese das infecções por *Salmonella* spp também está intimamente ligada à translocação de proteínas bacterianas para o interior da célula eucariótica, onde elas desempenham diferentes funções. Após a invasão, a destruição das células M e dos enterócitos faz com que a bactéria entre em contato com os macrófagos presentes no tecido sub-epitelial. *Salmonella* spp secreta proteínas efetoras que permitem que a bactéria sobreviva e se multiplique nos macrófagos (FERREIRA e CAMPOS, 2008).

Algumas proteínas importantes na patogênese de *Salmonella enterica* foram estudadas por Serrano (2009), como sideróforos do tipo ABC envolvidos na aquisição de Fe^{2+} e transportadores de íons de manganês Mn^{2+} , importantes para a sobrevivência e multiplicação nos tecidos do hospedeiro. Segundo Janakiraman e Slauch (2000), as proteínas transportadoras codificadas por um gene denominado *sitABCD* são importantes na fase sistêmica da doença.

Outros fatores de virulência envolvidos na patogênese de *Salmonella* são os codificados pelos genes *msgA*, *sifA* e *spaN*. O gene *msgA* é responsável pela produção de proteínas relacionadas com a capacidade de *Salmonella* spp sobreviver dentro dos macrófagos, uma característica fundamental para sua disseminação no tecido hospedeiro (SKYBERG et al., 2005). O gene *sifA* presente na SPI-2, está ligado à capacidade de *Salmonella* se replicar no citosol de diferentes células do hospedeiro. Alguns estudos indicam que em células epiteliais *Salmonella* spp tem uma replicação muito mais eficiente no citosol do que dentro de um vacúolo (BEUZÓN et al., 2002). O gene *spaN* (*invJ*) também desempenha um papel importante na patogenicidade de *Salmonella* spp, pois está relacionado com a capacidade de invasão de células não-fagocíticas, com consequente morte dos macrófagos e liberação de inúmeras células de *Salmonella* spp (SKYBERG et al., 2005).

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

As endotoxinas correspondentes à fração lipídica do lipopolissacarídeo da membrana celular da *Salmonella* spp também têm papel na patogenicidade, sendo responsáveis pelo efeito tóxico quando a bactéria sofre lise celular (D'AOUST e MAURER, 2007).

2.4.4 Susceptibilidade antimicrobiana

Na maioria das cepas de salmonelose, a manifestação clínica é uma enterite moderada auto-limitante com duração de 2 a 7 dias, e geralmente não há necessidade de antibioticoterapia. Entretanto, em indivíduos imunocomprometidos, idosos e crianças, assim como em casos de salmonelose severa ou sistêmica, a terapia antimicrobiana pode ser essencial (RUIZ et al., 2004). Por muitos anos, a ampicilina foi a droga mais utilizada para o tratamento de infecções severas por *Salmonella*, mas o aumento da resistência a este antimicrobiano tem reduzido significativamente a sua eficiência (WINOKUR et al., 2000; OLSEN et al., 2001).

Cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos, particularmente aquelas resistentes a múltiplas drogas representam, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública. O uso abusivo de antimicrobianos como agentes terapêuticos ou profiláticos na medicina humana, na medicina veterinária e também como promotores de crescimento na produção animal, tem provocado o surgimento de cepas resistentes (SKOV et al., 2007; GRAZIANI et al., 2008). Estudos sugerem que a fonte primária de salmoneloses causadas por cepas resistentes a antimicrobianos são os produtos de origem animal (SWARTZ, 2002), que podem ser responsáveis pela transferência destas cepas aos humanos pela cadeia alimentar (CARRAMIÑANA et al., 2004; NAYAK et al., 2004).

Infecções causadas por cepas resistentes a antimicrobianos são de tratamento difícil, pois são necessárias medidas terapêuticas alternativas. Além disso, o aumento das taxas de hospitalização, morbidade e mortalidade está associado à infecções por *Salmonella* spp multirresistente, sugerindo que a resistência antimicrobiana tem um papel importante na alteração da virulência destas cepas (TRAVERS e BARZA, 2002; THRELFALL et al., 2006).

No Brasil, embora não haja um programa de monitoramento com abrangência nacional, estudos relataram a ocorrência de cepas resistentes e multiresistentes de *S. Enteritidis* (FERNANDES et al., 2003; CARDOSO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006). *S. Infantis* (FONSECA et al., 2006), *S. Typhimurium*

(GHILARDI et al., 2006; BESSA et al., 2007), entre outros sorovares isolados de diferentes fontes.

No Brasil, a legislação proíbe a utilização de antimicrobianos na cadeia produtiva de alimentos de origem animal. O uso de clortetraciclina, oxitetraciclina, penicilinas e sulfonamidas sistêmicas para alimentação animal está proibido pela Portaria Ministerial nº 193, de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 1998) e as Instruções Normativas 9/2003 e 11/2004 proíbem o uso das drogas cloranfenicol e nitrofuranos e olaquinox (BRASIL, 2003). Na União Européia, o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento na produção animal está proibido desde 2006 (CASTANON, 2007). Já nos Estados Unidos, há poucas regulamentações sobre o uso de antimicrobianos, drogas como tetraciclina, penicilinas, macrolídeos, lincomicina e virginamicina ainda são aprovadas para uso como promotores de crescimento (SARMAH et al., 2006).

Apesar destas proibições, a prática do uso de antibióticos é comum, o que poderia favorecer a seleção de bactérias resistentes a estes antimicrobianos (VESSONI, 2004). No entanto, alguns estudos mostram que não há correlação entre o uso de drogas na medicina veterinária e o aumento do número de cepas resistentes. Threfall et al. (2006), verificaram que o aumento do uso veterinário de tetraciclina e ampicilina teve um impacto insignificante na incidência de resistência a estas drogas em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

2.4.5 Tipagem Molecular – Perfil de macrorrestrrição

A tipagem molecular de microrganismos é uma ferramenta importante para investigação de possível relação genética entre diferentes cepas no caso de uma investigação epidemiológica, assim como para o rastreamento de contaminação na cadeia de produção de alimentos (WOO e LEE, 2006, KÉROUANTON et al., 2007; STEVENS et al., 2008, CDC, 2010).

Entre as técnicas de tipagem molecular, a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, sigla inglesa) é considerada padrão ouro para a subtipagem de patógenos de alimentos devido ao seu alto poder de discriminação e

reprodutibilidade (HUNTER et al., 2005); KÉROUANTON et al., 2007). A PFGE é uma variação da eletroforese em gel, onde o campo elétrico aplicado ao gel varia de forma pulsada. Por esta técnica, é possível identificar a seqüência de nucleotídeos de uma região específica do DNA de um microrganismo, e não apenas sítios de restrição ou genes específicos, como ocorre em outras técnicas moleculares de tipagem (FOLEY et al., 2007).

Na PFGE, os microrganismos são incorporados em pequenos cubos de agarose (*plugs*), lisados, e o DNA digerido com enzimas de restrição. Os *plugs* então são colocados em um gel de agarose e submetidos a campos elétricos com direções alternadas, gerando perfis de bandas de DNA cromossomal. Os perfis produzidos são comparados entre si a fim de identificar a correlação entre eles. A alta reprodutibilidade do método é atribuída à imobilização do DNA dentro do *plug* de agarose, protegendo-o de possíveis danos mecânicos, garantindo assim que as bandas geradas sejam decorrentes da atividade da restrição enzimática e não causadas por outros fatores (FOLEY et al., 2007). Os dados gerados pela técnica de PFGE são compilados em uma rede nacional denominada *PulseNet*. Para que os dados enviados pelos laboratórios participantes sejam totalmente confiáveis e reprodutíveis, o CDC padronizou um protocolo de procedimento laboratorial denominado protocolo *PulseNet* (CDC, 2010).

A tipagem molecular por PFGE foi utilizada por Stevens et al. (2008) para a análise epidemiológica de *Salmonella* spp na cadeia produtiva de carne bovina no Senegal. Foram analisadas cepas isoladas de amostras de carne bovina de abatedouros oficiais e do varejo, pertencentes a diferentes sorovares. Com o uso da enzima de restrição *Xba*I, as cepas foram agrupadas em 17 genotipos diferentes, e os autores concluíram que os frigoríficos e os locais de comercialização da carne contribuíram de forma igual na contaminação com *Salmonella* spp, pois 56% das cepas eram provenientes dos abatedouros e 44% dos comércio. A contaminação as amostras no comércio foi atribuída ao manuseio inadequado e à presença de moscas.

3. OBJETIVOS

Dada a escassez de dados relativos à *Salmonella* spp na carne bovina de exportação produzida no Brasil, esse projeto objetivou:

1. Avaliar prevalência de *Salmonella* spp na cadeia produtiva de carne bovina para exportação, através de amostragem no couro do animal abatido, na carcaça após a esfolagem e na carcaça após a lavagem, antes da refrigeração.
2. Verificar os sorovares mais frequentes entre os isolados;
3. Investigar a presença de genes de virulência presentes nos isolados;
4. Determinar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados;
5. Verificar a correlação genética entre os isolados nos diferentes pontos amostrados (perfil de macrorrestrição, feito por PFGE).
6. Determinar nível de contaminação por *Salmonella* spp (UFC/cm²) nos pontos amostrados;

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com amostras coletadas em um grande abatedouro de bovinos localizado no interior do Estado de São Paulo, que produz carne bovina de exportação. Este abatedouro é responsável por cerca de 80% da carne bovina exportada pelo Brasil para a União Européia.

O estudo envolveu coletas de amostras de 200 animais, sendo 160 machos e 40 fêmeas, provenientes de 19 fazendas, localizadas em diferentes municípios dos Estados de Mato Grosso do Sul e São Paulo. Entre os animais estudados, 85 eram de criação a campo e 115 eram de criação em confinamento. O estudo foi realizado no período de fevereiro de 2009 e março de 2010.

4.1 Amostragem

O estudo foi desenvolvido com amostras coletadas em três pontos da cadeia de produção de carne bovina: 1- no couro do animal, antes da esfolagem (CO); 2- carcaça do mesmo animal depois da esfolagem (CA1) e 3 - carcaça do mesmo animal depois da lavagem, antes da refrigeração (CA2). Os pontos de coleta estão assinalados no esquema apresentado na Figura 1.

Para a identificação dos animais que fariam parte do estudo, afixou-se uma placa de plástico colorido na pata traseira no início do processo de abate, após a suspensão do animal na nória. Esta placa continuou afixada no animal até o final do processo de abate.

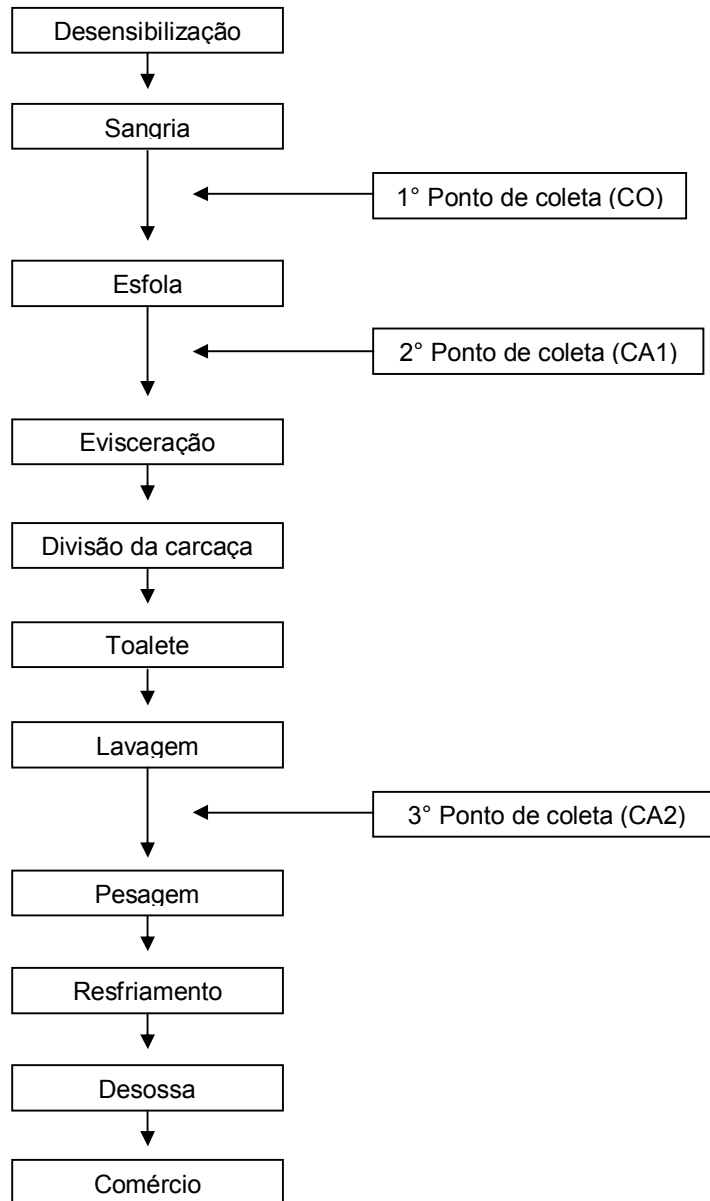


Figura 1- Esquema do abate de bovinos e processamento de carne bovina, com indicações dos pontos de coleta do presente estudo.

4.2 Coleta das amostras

Para coleta das amostras foram utilizadas esponjas de 11,5 x 23,0 cm desidratadas e esterilizadas (*Speci-Sponge*® - Nasco, EUA), seguindo normas internacionais (ANDREWS; HAMMACK, 1998). Para o uso, as esponjas foram

hidratadas adicionando-se 10 mL de solução Salina Peptonada (0,1% de peptona e 0,85% de NaCl) esterilizada ao saco plástico de acondicionamento das esponjas.

Com as mãos enluvasadas, duas esponjas foram removidas dos sacos plásticos e friccionadas em duas áreas de 10 x 10 cm do lado direito do peito do animal (200 cm²) e outras duas do lado esquerdo (200 cm²) (Fig. 2), perfazendo um total de 400 cm² de superfície amostrada. Este procedimento foi adotado para a coleta dos três pontos amostrados (CO, CA1 e CA2). As quatro esponjas foram transferidas para uma única bolsa plástica (Nasco, EUA), e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP/SP em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável. O acondicionamento e transporte das amostras foram realizados de acordo com Midura e Bryant (2001).

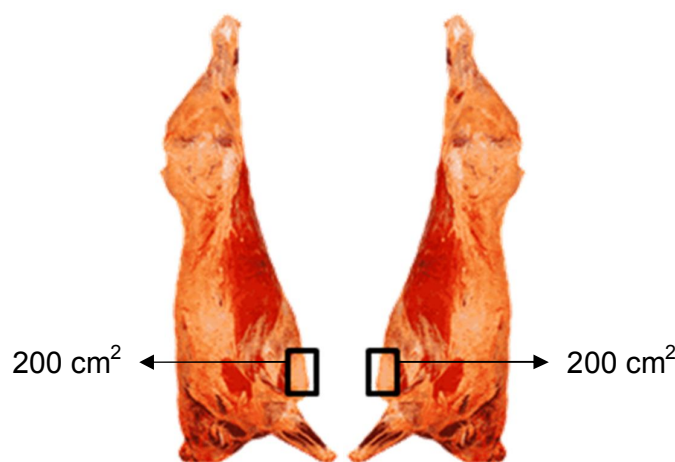


Figura 2- Pontos de coleta das carcaças bovinas das regiões onde amostras superficiais de 400 cm² foram coletadas.

4.3 Pesquisa de *Salmonella* spp

A pesquisa de *Salmonella* spp foi realizada conforme descrito na ISO 6579:2002 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2002).

Conforme esquematizado na Figura 3, a cada bolsa plástica contendo as quatro esponjas foram adicionados 200 mL de solução salina peptonada, sendo a mistura homogeneizada em *stomacher* (Lab Blender – Inglaterra) por 60 segundos. Uma alíquota de 40 mL desta suspensão foi centrifugada a 1000 x g a 5° C por

15 minutos (Centrífuga Sorvall Instruments, RC-5C, rotor GSA, Du Point, Brasil) e o sedimento ressuspenso em solução peptonada tamponada (Oxoid) e incubado a 37° C por 18 h.

Após a incubação, 0,1 mL da suspensão foram transferidos para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) (Oxoid), incubando-se a 41,5° C por 24 horas em banho-maria. Outra porção de 1 mL da suspensão foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo tetracionato Muller-Kauffmann com novobiocina (MKTTn) (Oxoid), previamente acrescentado de 0,2 mL da solução de iodo (20 g de iodo + 25 g de iodeto de potássio em 100 mL de água destilada), incubando-se a 37° C por 24 horas. Os dois caldos foram homogeneizados utilizando um agitador *Vortex*. Após a incubação, uma porção de cada caldo foi semeado por esgotamento em placas contendo ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) (Oxoid) e ágar MLCB (Oxoid), empregando-se uma alça plástica de 1 µL (Copan Diagnostics – EUA). As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Três a 5 colônias características de pertencerem ao gênero *Salmonella* spp foram estriadas em placas contendo ágar triptona soja (TSA – Oxoid), e submetidas a testes fenotípicos utilizando-se o kit Painel para Enterobactérias (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., Brasil) e ao teste de aglutinação em lâmina com soro polivalente anti-*Salmonella* (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., Brasil), conforme esquematizado na Figura 3. Como controle, empregou-se *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

O kit Painel para Enterobactérias (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., Brasil) compreende 23 testes:

- Produção de indol, acetoina, H₂S e triptofano desaminase;
- Hidrólise da uréia e esculina;
- Utilização de citrato de Simmons;
- Descarboxilação de lisina, arginina e ornitina;
- Degradação de malonato;
- Oxidação de glicose;

- Fermentação de glicose, lactose, manitol, adonitol, mioinositol, sorbitol, rafnose, ramnose, maltose e melobiose;

- Produção de β -galactosidase.

As cepas identificadas como pertencentes ao gênero *Salmonella* spp pelos testes bioquímicos e sorológicos foram mantidas a temperatura de -70°C em solução peptonada 1% adicionada de 0,5 % de NaCl (Synth) e 25 % de glicerol (Synth).

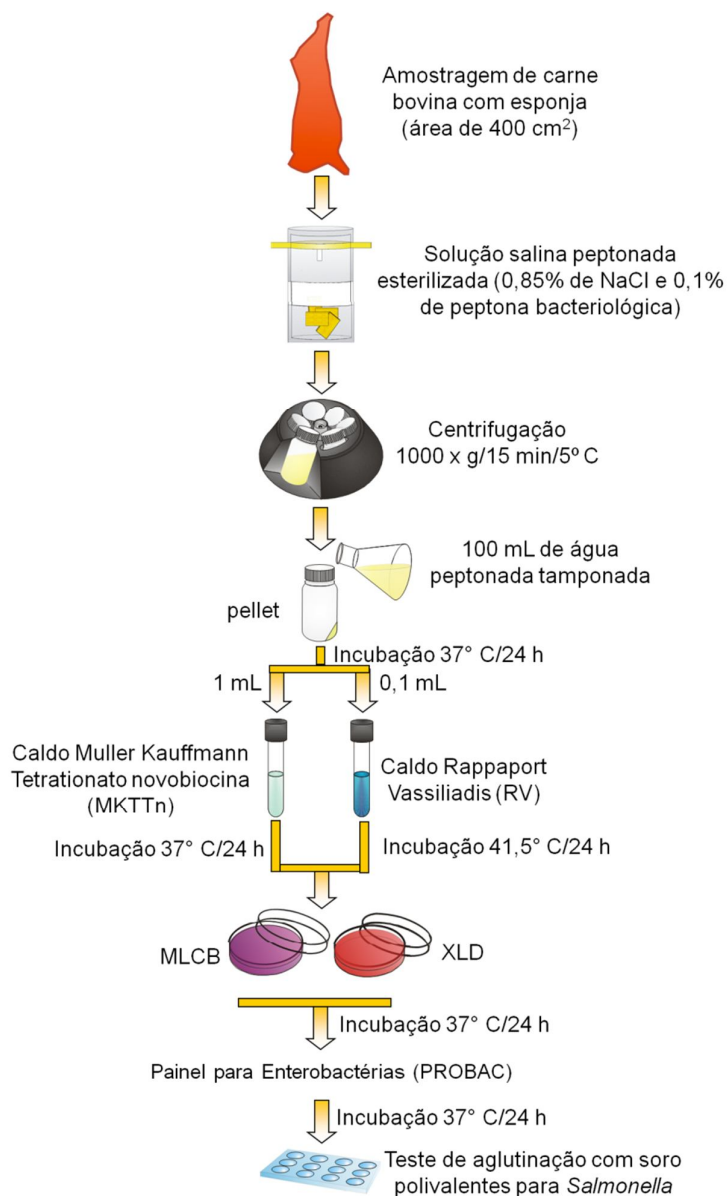


Figura 3- Esquema da metodologia de pesquisa de *Salmonella* spp nas amostras de couro e carcaças bovinas.

4.4 Confirmação da identificação de *Salmonella* spp por PCR

4.4.1 Obtenção do DNA teste

As cepas de *Salmonella* spp foram semeadas em placas de Petri contendo TSA e incubadas a 37° C por 18-24 horas. Uma porção da cultura foi transferida para microtubos contendo 100 µL de água ultra-purificada esterilizada (Milli-Q, Millipore), homogeneizada e submetida a aquecimento em banho seco AccuBlock – Digital Dry Bath (Labnet, USA) a 100° C por 10 minutos. Após imediato resfriamento em gelo, o material foi centrifugado a 14000 x g por 3 segundos e congelado a -20° C até o momento de ser utilizado.

4.4.2 Reação da PCR

A metodologia PCR foi realizada segundo Myint et al. (2006), empregando-se os *primers* apresentados na Tabela 1. A PCR foi realizada adicionando-se 32,75 µL de H₂O, 5 µL de 10 x Taq buffer (Fermentas Life Sciences – Canadá), 4 µL de MgCl₂, 1 µL de dntp, 1 µL de cada primer (ST 11e ST 15), 0,25 µL da Taq e 5 µL do DNA teste para 50 µL de reação. A amplificação foi realizada através de um aquecimento inicial (desnaturação) a 94° C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95° C; 30 segundos a 60° C e 30 segundos a 72° C e uma extensão final por 10 minutos a 72° C em termociclador (Eppendorf). Como controle positivo foi utilizado *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e como controle negativo foi utilizado *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabela 1. Sequência dos *primers* utilizados na reação de PCR para confirmação dos isolados de *Salmonella* spp*.

Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)	Gene Alvo
AGCCAACCATTGCTAAATTGGCGCA (ST11)	429	2.3kb JEO402-1
GGTAGAAATTCCCAGCGGGTACTG (ST15)		

*De acordo com Aabo et al., 1993.

4.4.3 Análise do produto amplificado

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X (tampão borato EDTA – pH 8,2). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal gel XL Ultra V2 (Labnet, USA) por 40 minutos a 70 V, contendo TBE 0,5X. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio ($1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) (Pharmacia, USA) e a imagem registrada com o auxílio do sistema EDAS120 (Eastman Kodak, USA), sob transiluminação UV 320 nm.

4.5 Sorotipagem completa

As cepas de *Salmonella* spp confirmadas pela reação de PCR foram enviadas ao Laboratório de Enterobactérias do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizada no Estado do Rio de Janeiro, Brasil, para sorotipagem completa.

4.6 Enumeração de *Salmonella* spp

Para enumeração de *Salmonella* spp, uma alíquota da solução peptonada tamponada (Oxoid) contendo o sedimento ressuspense, preparado conforme descrito anteriormente no item 4.3, foi submetida a três diluições decimais seriadas em solução salina peptonada 0,85%, e 0,1 mL de cada diluição foram semeados na superfície de ágar MLCB (Oxoid) com alça de Drigalski, e incubados a 37° C por 24 horas. Quando presentes, as colônias características de *Salmonella* spp foram enumeradas e submetidas aos testes de identificação descritos anteriormente nos itens 4.4.

4.7 Pesquisa de genes de virulência

As cepas de *Salmonella* spp isoladas foram investigadas quanto à presença dos genes de virulência *invA*, *sitC*, *spaN*, *sifA* e *msgA*, segundo Skyberg et al. (2006), com modificações. O isolamento do DNA foi realizado conforme descrito no item 4.4.1. Para reação da PCR foram empregados os primers apresentados na

Tabela 2. A PCR foi realizada adicionando-se 11,85 µL de H₂O, 2,5 µL de 10 x Taq buffer (Fermentas Life Science, Canadá), 7 µL de 50 mM MgCl₂, 0,5 µL de 10 mM dntp, 0,05 µL de 1 mM cada primer *forward* e *reverse* (*invA*, *sitC*, *spaN*, *sifA* e *msgA*), 0,15 µL da Taq (5 U/µL) e 2,5 µL do DNA teste para 25 µL de reação. A amplificação foi realizada através de um aquecimento inicial a 95° C por 5 minutos, seguida de 25 ciclos de 30 segundos a 94° C; 30 segundos a 66,5° C e 2 minutos a 72° C e uma extensão final por 10 minutos a 72° C. Como controle positivo foi utilizado *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e como controle negativo foi utilizado *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados na pesquisa dos genes de virulência nos isolados de *Salmonella* spp.

Gene	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>invA</i>	F: CTGGCGGTGGGTTTTGTTGTCTTCTCTATT R: AGTTTCTCCCCCTTTCATGCGTTACCC	1070
<i>sitC</i>	F: CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC R: CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768
<i>spaN</i>	F: AAAAGCCGTGGAATCCGTTAGTGAAGT R: CAGCGCTGGGATTACCGTTTTG	504
<i>sifA</i>	F: TTTGCCGAACGCGCCCCCACACG R: GTTGCCTTTTCTTGCGCTTTCACCCATCT	449
<i>msgA</i>	F: GCCAGGCGCACGCGAAATCATCC R: GCGACCAGCCACATATCAGCCTCTCTTCAAAC	189

4.7.1 Análise do produto amplificado

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X (tampão borato EDTA – pH 8,2). A eletroforese foi realizada em cuba horizontal Gel XL Ultra V2 (Labnet, USA) por 40 minutos a 70 V, contendo TBE 0,5X. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (1 µg.mL⁻¹) (Pharmacia, USA) e a imagem registrada com o auxílio do sistema EDAS120 (Eastman Kodak, USA), sob transiluminação UV 320 nm.

4.8 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp isoladas foi determinado de acordo com *The Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), empregando-se as fitas M.I.C.Evaluator™ (Oxoid) com os seguintes antimicrobianos: ampicilina, cefotaxima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem e tetraciclina. Para o teste, preparou-se uma cultura de cada cepa de *Salmonella* spp em caldo triptona soja, incubando-se a 37° C, até atingir a turvação equivalente ao valor 0,5 da escala de McFarland, (aproximadamente 2 horas). Uma alíquota de cada cultura foi semeada em uma placa contendo ágar Muller-Hinton, espalhando-se o inóculo por toda a superfície do agar com auxílio de um *swab*. Em seguida, as fitas M.I.C.Evaluator™ foram colocadas na superfície das placas, que foram incubadas a 37° C por 24 horas. Como controle foi utilizado *Escherichia coli* ATCC 25922. Os resultados de resistência, sensibilidade ou resistência intermediária foram interpretados de acordo com as instruções do fabricante.

4.9 Perfil de macrorrestrrição por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A PFGE foi realizada conforme protocolo para *Salmonella* spp preconizado pelo *PulseNet*, CDC (2010).

4.9.1 Preparo da suspensão celular

Os isolados e a cepa de *Salmonella* sorovar Braenderup utilizada como marcador de peso molecular no protocolo *PulseNet* segundo Hunter et al. (2005), foram inoculados por técnica de esgotamento na superfície de placas contendo TSA e incubadas a 37° C por 24 h. Após a verificação da pureza das culturas, uma colônia foi estriada na superfície de uma nova placa de TSA e incubada a 37° C por 18 horas, para a obtenção de crescimento em massa.

A massa celular na superfície da placa de TSA foi removida com o auxílio de alça descartável e transferida para tubos de ensaio contendo 3 mL de Tampão de Suspensão Celular (sigla inglesa CSB) [100mM Tris (Pharmacia): 10mM EDTA pH

8,00]. A absorbância dessa suspensão a 610 nm (Ultrospec 2000 – Pharmacia) foi determinada e ajustada para 0,8 - 1,0, com adição de CSB de forma a obter uma suspensão celular adequada para a PFGE.

Uma alíquota de 400 µL da suspensão celular ajustada foi transferida para tubos Eppendorf, os quais se adicionou 20 µL de uma solução de proteinase K (20 mg.mL⁻¹) (Sigma, Nova Iorque, EUA), agitando-se suavemente.

4.9.2 Preparo dos blocos de agarose

Os tubos contendo a suspensão celular foram adicionados de 400 µL de solução de agarose [Seakem Gold Agarose (Lonza, Rockland, EUA)] em 1% de TE (10mM Tris: 1mM EDTA, pH 8,00). Após homogeneização desta mistura, aproximadamente 300 µL foram transferidos para os moldes (BioRad, Califórnia, EUA) e mantidos à temperatura ambiente para a solidificação e formação dos blocos (plugs) de agarose.

4.9.3 Lise celular e lavagens

Após a solidificação, os blocos de agarose foram transferidos para tubos tipo Falcon (50 mL) contendo 5 mL de solução de lise [50 mM Tris: 50 mM EDTA, pH 8 + 1% de Sarcosyl] e 25 µL de solução de proteinase K (20mg. mL⁻¹) e incubados a 54° C por 2 horas sob agitação de 150 rpm. Os blocos foram submetidos a duas lavagens adicionando-se 15 mL de água ultrapura obtida em Mili-Q, esterilizada e pré-aquecida a 50° C, com agitação a 54° C por 10 minutos, e mais quatro lavagens com 15 mL de tampão TE esterilizado, pré-aquecido a 50° C, com agitação a 54° C por 10 minutos. Os blocos de agarose foram armazenados em tubos contendo 15 mL de tampão TE, sob refrigeração, até a execução da reação de restrição.

4.9.4 Reação de Restrição

Para o teste, porções dos blocos de agarose com aproximadamente 2,0 - 2,5 mm foram transferidos para tampão 1 x NE 2 inicial (New England Biolabs, Ipswich, EUA) e mantidos à temperatura ambiente por 15 minutos. Após a retirada

do tampão inicial acrescentou-se 200 μL da solução de tampão de restrição e incubou-se a 37° C por 10 minutos. Em seguida, a solução de tampão (Tango) foi removida e acrescentou-se 200 μL da mistura de restrição [1 x Tango; 10 U. μL^{-1} Xbal (Fermentas)]. Após leve agitação os tubos foram incubados a 37° C por 2 horas. Os blocos de agarose foram armazenados em tubos com 5 mL de tampão TE, sob refrigeração, até o momento da utilização.

4.9.5 Eletroforese

Os produtos da restrição enzimática foram separados através de eletroforese em gel de agarose (1% Seakem Gold Agarose) em tampão TBE 0,5 X empregando-se o aparelho Gene Navigator System (Pharmacia) com os seguintes parâmetros: tempo de corrida = 17h, 6V, ângulo = 120°, temperatura do tampão = 14° C, tempo inicial = 2,2 seg e tempo final = 63,8 seg. Após a eletroforese, o gel foi corado por 30 minutos em solução aquosa de brometo de etídio (1 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) e examinado sob transiluminação UV 320 nm, sendo a imagem registrada com o auxílio do sistema EDAS120.

4.9.6 Análise dos resultados

Os padrões de bandas gerados foram comparados visualmente e agrupados em perfis. A correlação entre os perfis obtidos foi avaliada com o auxílio do programa BioNumerics 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica) utilizando-se o coeficiente de Dice (Dice, 1945) e análises de clusters UPGMA (Unweighed Pair Group Method Using Arithmetic Average) (Sneath e Sokal, 1973) para gerar o Dendograma, com valor de tolerância de 2%.

Para interpretação dos resultados, perfis com similaridade $\geq 80\%$ foram considerados semelhantes e aqueles com similaridade de 100% foram considerados perfis clonais.

5. RESULTADOS

5.1 Positividade para *Salmonella* spp

A positividade para *Salmonella* spp nas amostras estudadas está apresentada na Figura 4 e Quadro 1. Os resultados indicam que, dos 200 animais analisados, 31 (15,5%) apresentaram *Salmonella* spp no CO (animais 6, 20, 26, 30, 71, 76, 90, 92, 95, 101, 102, 114, 122, 129, 130, 131, 132, 134, 135, 136, 139, 140, 141, 143, 149, 159, 164, 171, 177, 184 e 185). Quanto à positividade para *Salmonella* spp nas carcaças, verificou-se presença do patógeno na CA1 de sete (3,5%) animais (animais 21, 128, 129, 165, 176, 180 e 181) e na CA2 de seis (3%) animais (animais 24, 129, 130, 138, 140 e 178). Apenas três animais apresentaram positividade em mais de um ponto, sendo que o animal 129 foi positivo nos três pontos amostrados, enquanto os animais 130 e 140 foram positivos no CO e na CA2, mas negativos na CA1.

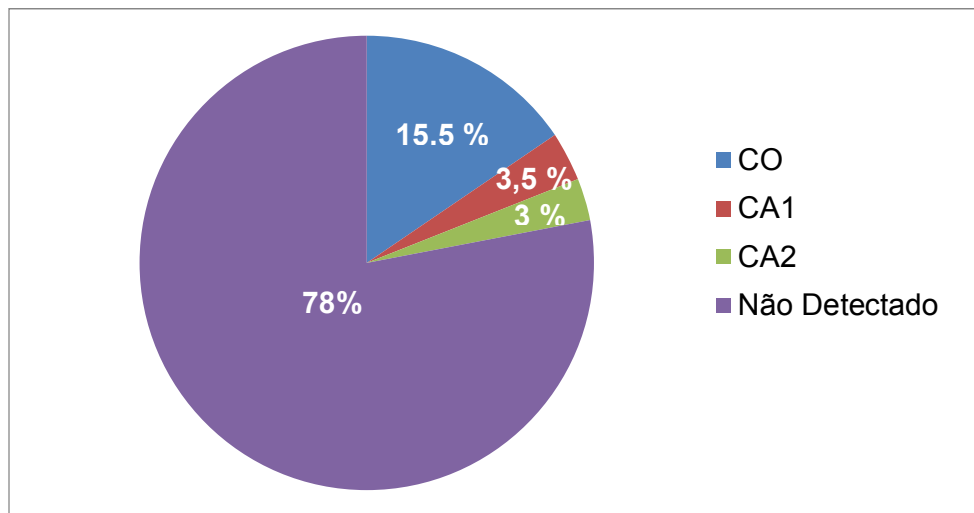


Figura 4- Positividade para *Salmonella* spp no couro (CO) dos animais estudados e nas carcaças após a esfolagem (CA1) e após a lavagem, antes da refrigeração (CA2).

Quadro 1- Positividade para *Salmonella* spp nas amostras bovinas de acordo com a data da coleta das amostras, a origem do animal (Fazenda / Estado) e o ponto amostrado.

Data	Animal	Fazenda Estado	CO	CA1	CA2	Data	Animal	Fazenda Estado	CO	CA1	CA2
10/02/2009	1	A - MS				16/06/2009	51	I - MS			
	2	A - MS					52	I - MS			
	3	A - MS					53	I - MS			
	4	A - MS					54	I - MS			
	5	A - MS					55	I - MS			
	6	A - MS					56	I - MS			
	7	A - MS					57	J - SP			
	8	A - MS					58	J - SP			
	9	A - MS					59	J - SP			
	10	A - MS					60	J - SP			
	11	A - MS					61	J - SP			
	12	B - MS					62	K - MS			
	13	B - MS					63	K - MS			
	14	B - MS					64	K - MS			
10/03/2009	15	C - MS				65	K - MS				
	16	C - MS				66	K - MS				
	17	C - MS				67	K - MS				
	18	C - MS				68	K - MS				
	19	C - MS				69	K - MS				
	20	C - MS				70	K - MS				
	21	C - MS				71	L - SP				
	22	D - MS				72	L - SP				
	23	D - MS				73	L - SP				
	24	D - MS				74	L - SP				
	25	D - MS				75	L - SP				
	26	D - MS				76	L - SP				
	27	D - MS				77	L - SP				
	28	D - MS				78	L - SP				
	29	E - MS				79	L - SP				
	30	E - MS				80	L - SP				
	31	E - MS				81	L - SP				
	32	E - MS				82	L - SP				
05/05/2009	33	F - SP				83	L - SP				
	34	F - SP				84	L - SP				
	35	F - SP				85	L - SP				
	36	F - SP				86	L - SP				
	37	G - MS				87	M - SP				
	38	F - SP				88	M - SP				
	39	H - MS				89	M - SP				
	40	H - MS				90	M - SP				
	41	H - MS				91	M - SP				
	42	H - MS				92	M - SP				
	43	H - MS				93	M - SP				
	44	H - MS				94	M - SP				
	45	H - MS				95	M - SP				
	46	G - MS				96	M - SP				
	47	G - MS				97	M - SP				
	48	G - MS				98	M - SP				
	49	G - MS				99	M - SP				
50	G - MS				100	M - SP					

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfola; CA2- Carcaça após a lavagem; MS- Mato Grosso; SP- São Paulo; Quadros negros- positividade para *Salmonella* sp; Quadros brancos- *Salmonella* spp não detectada.

(continua)

Quadro 1- Positividade para *Salmonella* spp nas amostras bovinas de acordo com a data de coleta das amostras, a origem do animal (Fazenda / Estado) e o ponto amostrado (cont.).

Data	Animal	Fazenda Estado	CO	CA1	CA2	Data	Animal	Fazenda Estado	CO	CA1	CA2
11/08	101	M - SP	■			24/11/2009	151	R - SP			
	102	M - SP					152	R - SP			
09/09/2009	103	N - SP					153	R - SP			
	104	N - SP					154	R - SP			
	105	N - SP					155	R - SP			
	106	N - SP					156	R - SP			
	107	N - SP					157	R - SP			
	108	N - SP					158	R - SP			
	109	N - SP					159	R - SP	■		
	110	O - MS					160	R - SP			
	111	O - MS					161	R - SP			
	112	O - MS					162	R - SP			
	113	O - MS					163	R - SP			
	114	O - MS	■				164	R - SP	■		
	115	O - MS					165	R - SP		■	
	116	O - MS					166	S - MS			
	117	O - MS					167	S - MS			
	118	O - MS					168	S - MS			
	119	O - MS					169	S - MS			
	120	O - MS					170	S - MS			
	121	O - MS				171	S - MS	■			
	122	O - MS	■			172	S - MS				
	123	O - MS				173	S - MS				
	124	O - MS				174	S - MS				
	125	O - MS				175	S - MS				
	126	O - MS				176	S - MS		■		
	127	O - MS				177	S - MS	■		■	
14/10/2009	128	P - SP		■	■	178	S - MS			■	
	129	P - SP	■		■	179	S - MS				
	130	P - SP			■	180	S - MS			■	
	131	P - SP				181	S - MS			■	
	132	Q - SP				182	S - MS				
	133	Q - SP				183	S - MS				
	134	Q - SP	■			184	S - MS	■			
	135	Q - SP				185	S - MS				
	136	Q - SP	■			186	R - SP				
	137	Q - SP				187	R - SP				
	138	Q - SP			■	188	R - SP				
	139	Q - SP	■			189	R - SP				
	140	Q - SP			■	190	R - SP				
	141	Q - SP	■			191	R - SP				
	142	Q - SP				192	R - SP				
	143	Q - SP	■			193	R - SP				
	144	Q - SP				194	R - SP				
	145	Q - SP				195	R - SP				
	146	Q - SP				196	R - SP				
	147	Q - SP				197	R - SP				
24/11/2009	148	R - SP				198	R - SP				
	149	R - SP	■			199	R - SP				
	150	R - SP				200	R - SP				

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfolagem; CA2- Carcaça após a lavagem; MS- Mato Grosso; SP- São Paulo; Quadros negros- positividade para *Salmonella* sp; Quadros brancos- *Salmonella* spp não detectada.

Conforme apresentados no Quadro 1, é possível verificar que a maior positividade para *Salmonella* spp foi observada nos animais amostrados no dia

14/10/2009, quando, dos 20 animais estudados, 11 foram positivos para o patógeno no CO, dois na CA1 e quatro na CA2. Os três animais que apresentaram positividade em mais de um ponto pertenceram a este grupo de animais. Todas as demais coletas de amostras resultaram em uma positividade para *Salmonella* spp muito mais baixa, independentemente do ponto de coleta considerado.

A Figura 5 apresenta a distribuição das amostras positivas para *Salmonella* spp de acordo com o ponto amostrado e a época do ano em que estas amostras foram coletadas. As amostras coletadas em apenas duas datas (10/2009 e 11/2009) foram responsáveis por quase metade de todas as amostras positivas (45% das amostras positivas de CO, 43% das amostras positivas de CA1 e 66% das amostras positivas de CA2). Dos 38 animais amostrados nestas duas datas (Quadro 1), *Salmonella* spp foi encontrada no CO de 14 animais, na CA1 de três animais e na CA2 de quatro animais, enquanto a outra metade das amostras positivas foi obtida em nove coletas diferentes, ressaltando-se ainda que naquelas realizadas em três datas (05/2009, 06/2009 e 03/2010) nenhuma das amostras foi positiva para *Salmonella* spp.

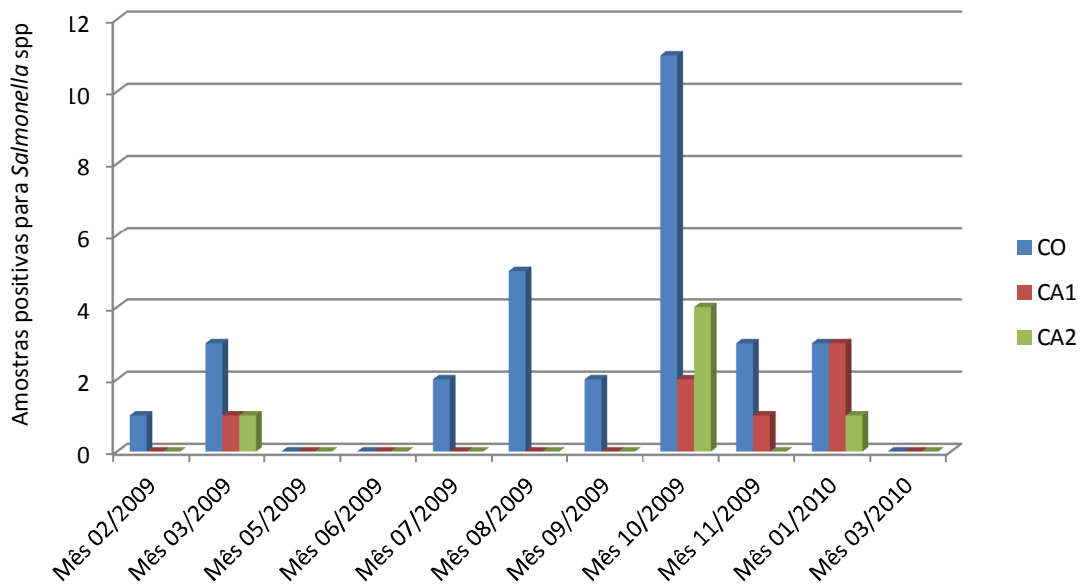


Figura 5- Distribuição das amostras positivas para *Salmonella* spp, de acordo com o ponto da linha de abate amostrado e o mês de coleta das amostras.

Conforme pode ser observado também na Figura 5, foram encontradas amostras de carcaça após a esfolagem CA2 positivas para *Salmonella* spp somente

entre aquelas coletadas nos meses 03/2009 (uma amostra), 10/2009 (quatro amostras) e 01/2010 (uma amostra), sendo todas as demais negativas.

A positividade para *Salmonella* spp de acordo com a procedência do animal analisado, o tipo de criação e o ponto amostrado, bem como os sorovares dos isolados obtidos, estão apresentados na Tabela 3. Conforme pode ser verificado, dentre as 31 amostras de couro positivas para *Salmonella* spp, 23 (74,2%) eram de animais provenientes de fazendas com sistema de confinamento e 8 (25,8%) eram de animais provenientes de fazendas com sistema de criação a campo.

Em relação aos sorovares dos isolados de *Salmonella* spp apresentados nas Tabelas 3 e 4, verificou-se uma prevalência do sorovar *S. Infantis* (54,5%), seguido de *S. Enteritidis* (13,6%), *S. Panama* (11,4%), *S. Newport* (6,8%), *S. Agona* (6,8%). Foram ainda detectados os sorovares de *S. Muenster* (2,3%), *S. Orion* (2,3%) e *S. Give* (2,3%).

Tabela 3- Características dos isolados de *Salmonella* spp de acordo com a procedência dos animais, tipo de criação, ponto amostrado e sorovar encontrado.

Procedências dos animais	Tipo de criação	Nº da amostra / ponto amostrado	Sorovar
Fazenda A – MS	A campo	6 / CO	S. Give
Fazenda C – MS	A campo	20 / CO	S. Panama
Fazenda D – MS	A campo	26 / CO	S. Newport
Fazenda E – MS	A campo	30 / CO	S. Agona
Fazenda S - MS	A campo	171 / CO	S. Enteritidis
Fazenda S – MS	A campo	177 / CO	S. Orion
Fazenda S – MS	A campo	184 / CO	S. Infantis
Fazenda S – MS	A campo	185 / CO	S. Infantis
Fazenda C – MS	A campo	21 / CA1	S. Panama
Fazenda S – MS	A campo	176 / CA1	S. Enteritidis
Fazenda S – MS	A campo	180 / CA1	S. Muenster
Fazenda S – MS	A campo	181 / CA1	S. Infantis
Fazenda D – MS	A campo	24 / CA2	S. Newport
Fazenda S – MS	A campo	178 / CA2	S. Enteritidis
Fazenda L – SP	Confinamento	71 / CO	S. Agona
Fazenda L – SP	Confinamento	76 / CO	S. Infantis
Fazenda M – SP	Confinamento	90 / CO	S. Agona
Fazenda M – SP	Confinamento	92 / CO	S. Panama
Fazenda M – SP	Confinamento	95 / CO	S. Newport
Fazenda M – SP	Confinamento	101 / CO	S. Panama
Fazenda M – SP	Confinamento	102 / CO	S. Panama
Fazenda O – MS	Confinamento	114 / CO	S. Infantis
Fazenda O – MS	Confinamento	122 / CO	S. Infantis
Fazenda P – SP	Confinamento	129 / CO	S. Infantis
Fazenda P – SP	Confinamento	130 / CO	S. Infantis

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfolagem; CA2- Carcaça após a lavagem

(continua)

Tabela 3- Características dos isolados de *Salmonella* spp de acordo com a procedência dos animais, tipo de criação, ponto amostrado e sorovar encontrado (cont.).

Procedências dos animais	Tipo de criação	Nº da amostra / ponto amostrado	Sorovar
Fazenda P – SP	Confinamento	131 / CO	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	132 / CO	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	134 / CO	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	135 / CO	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	136 / CO	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	139 / CO	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	140 / CO	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	141/ CO	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	143 / CO	S. Enteritidis
Fazenda R – SP	Confinamento	149 / CO	S. Enteritidis
Fazenda R – SP	Confinamento	159 / CO	S. Enteritidis
Fazenda R – SP	Confinamento	164 / CO	S. Infantis
Fazenda P – SP	Confinamento	128 / CA1	S. Infantis
Fazenda P – SP	Confinamento	129 / CA1	S. Infantis
Fazenda R – SP	Confinamento	165 / CA1	S. Infantis
Fazenda P – SP	Confinamento	129 / CA2	S. Infantis
Fazenda P – SP	Confinamento	130 / CA2	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	138 / CA2	S. Infantis
Fazenda Q – SP	Confinamento	140 / CA2	S. Infantis

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfola; CA2- Carcaça após a lavagem;

5.2 Genes de virulência nos isolados de *Salmonella* spp

Conforme descrito na Tabela 4, do total de 44 isolados de *Salmonella* spp estudados, 26 (59,1%) apresentaram todos os genes de virulência pesquisados. Todos os isolados apresentaram pelo menos dois dos cinco genes de virulência pesquisados, sendo que 42 isolados (95,5%) apresentaram o gene *invA*, 35 (79,5%) apresentaram o gene *sitC*; 33 (75,0%) apresentaram o gene *spaN*, 34 (77,3%) apresentaram o gene *sifA* e 40 (90,9%) apresentaram o gene *msgA*.

Tabela 4 - Positividade dos isolados de *Salmonella* spp aos genes de virulência estudados.

Animal/ Ponto de coleta	Sorovar	Gene de Virulência				
		<i>invA</i>	<i>sitC</i>	<i>spaN</i>	<i>sifA</i>	<i>msgA</i>
6 / CO	S. Give	+	-	-	-	+
20 / CO	S. Panama	+	-	-	-	+
26 / CO	S. Newport	+	+	+	+	+
30 / CO	S. Agona	+	+	+	+	+
71 / CO	S. Agona	+	+	-	-	+
76 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
90 / CO	S. Agona	+	-	+	+	+
92 / CO	S. Panama	+	-	+	+	+
95 / CO	S. Newport	+	-	-	-	+
101 / CO	S. Panama	+	-	+	+	+
102 / CO	S. Panama	+	+	-	-	-
114 / CO	S. Infantis	+	-	+	+	+
122 / CO	S. Infantis	+	+	-	-	-
129 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
130 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
131 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
132 / CO	S. Infantis	+	+	-	+	+
134 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
135 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
136 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
139 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
140 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
141 / CO	S. Infantis	-	+	+	+	+
143 / CO	S. Enteritidis	+	+	+	+	+
149 / CO	S. Enteritidis	+	+	+	+	+
159 / CO	S. Enteritidis	+	+	+	+	+
164 / CO	S. Infantis	-	+	+	-	+
171 / CO	S. Enteritidis	+	+	+	+	+
177 / CO	S. Orion	+	+	+	+	+
184 / CO	S. Infantis	+	+	+	+	+
185 / CO	S. Infantis	+	+	-	-	+

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfola; CA2- Carcaça após a lavagem;
+ detectado; - não detectado.

(continua)

Tabela 4 - Positividade dos isolados de *Salmonella* spp aos genes de virulência estudados (cont.).

Animal/ Ponto de coleta	Sorovar	Gene de Virulência				
		<i>invA</i>	<i>sitC</i>	<i>spaN</i>	<i>sifA</i>	<i>msgA</i>
21 / CA1	S. Panama	+	-	-	-	+
128 / CA1	S. Infantis	+	+	-	-	-
129 / CA1	S. Infantis	+	+	+	+	+
165 / CA1	S. Infantis	+	-	-	+	+
176 / CA1	S. Enteritidis	+	+	+	+	-
180 / CA1	S. Muenster	+	+	+	+	+
181 / CA1	S. Infantis	+	+	+	+	+
24 / CA2	S. Newport	+	+	+	+	+
129 / CA2	S. Infantis	+	+	+	+	+
130 / CA2	S. Infantis	+	+	+	+	+
138 / CA2	S. Infantis	+	+	+	+	+
140 / CA2	S. Infantis	+	+	+	+	+
178 / CA2	S. Enteritidis	+	+	+	+	+

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfolagem; CA2- Carcaça após a lavagem;
+ detectado; - não detectado.

5.3 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana de cada um dos 44 isolados estudados está apresentado na Tabela 5. Verificou-se que todos os isolados foram sensíveis à cefotaxima, ciprofloxacina, imipenem e gentamicina e que 5 (11,4%) isolados foram resistentes à ampicilina e à tetraciclina simultaneamente, sendo que três destes isolados foram provenientes do couro CO dos animais 143, 149, 159 e 171 e um da carcaça CA2 do animal 178. Além disso, 23 isolados (52,3%) apresentaram perfil de resistência intermediária à tetraciclina. Estes isolados foram provenientes igualmente do couro CO (16 dos 31 isolados testados), quanto das carcaças CA1 (4 dos 7 isolados testados) e CA2 (3 dos 6 isolados testados).

A figura 6 mostra exemplos de placas com fitas M.I.C. Evaluator com a cultura controle (figura 6A) e com um isolado de *Salmonella* spp. resistente à ampicilina e tetraciclina (figura 6B).

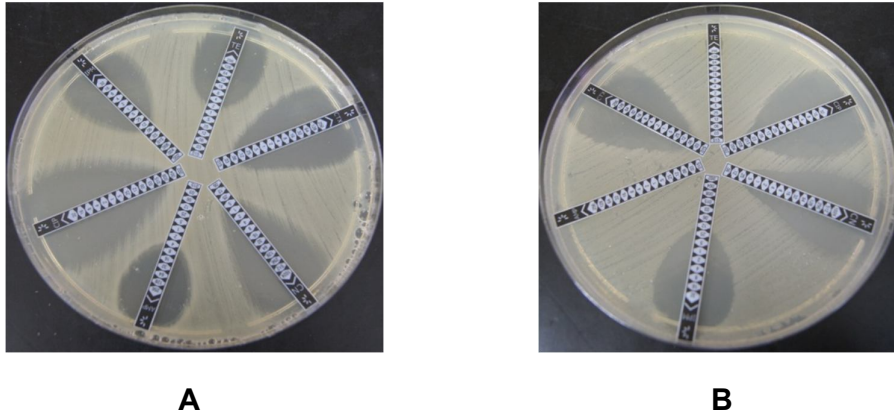


Figura 6- Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos com fitas M.I.C.EvaluatorTM onde **A-** Controle *E. coli* ATCC 25922, sensível aos seis antibióticos, e **B-** isolado de *Salmonella* spp resistente à ampicilina e tetraciclina

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Salmonella* spp.

Animal	Ponto de coleta	Sorovar	Antimicrobianos (Siglas)					
			CIM ($\mu\text{g/mL}$) / Interpretação (S/I/R)					
			Ampicilina AMP	Cefotaxima CTX	Ciprofloxacina CIP	Imipenem IPM	Gentamicina CN	Tetraciclina TE
6	CO	S. Give	2,0 / S	0,06 / S	0,012 / S	0,25 / S	0,38 / S	4 / S
20	CO	S. Panama	2,0 / S	0,12 / S	0,012 / S	0,19 / S	0,50 / S	4 / S
26	CO	S. Newport	2,0 / S	0,09 / S	0,008 / S	0,12 / S	0,50 / S	4 / S
30	CO	S. Agona	2,0 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,25 / S	0,38 / S	8 / I
71	CO	S. Agona	1,5 / S	0,19 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,50 / S	4 / S
76	CO	S. Infantis	1,5 / S	0,19 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,50 / S	6 / I
90	CO	S. Agona	1,5 / S	0,19 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,38 / S	6 / I
92	CO	S. Panama	2,0 / S	0,09 / S	0,012 / S	0,12 / S	0,50 / S	6 / I
95	CO	S. Newport	3,0 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,38 / S	8 / I
101	CO	S. Panama	2,0 / S	0,12 / S	0,012 / S	0,12 / S	0,25 / S	6 / I
102	CO	S. Panama	1,5 / S	0,09 / S	0,012 / S	0,12 / S	0,38 / S	4 / S
114	CO	S. Infantis	1,0 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,38 / S	6 / I
122	CO	S. Infantis	2,0 / S	0,19 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,25 / S	6 / I
129	CO	S. Infantis	2,0 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,50 / S	6 / I
130	CO	S. Infantis	2,0 / S	0,19 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,25 / S	6 / I
131	CO	S. Infantis	2,0 / S	0,12 / S	0,012 / S	0,19 / S	0,50 / S	4 / S
132	CO	S. Infantis	2,0 / S	0,25 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,50 / S	6 / I

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfolagem; CA2- Carcaça após a lavagem; S- Sensível; I- Intermediário; R- Resistente

(Continua)

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Salmonella* spp (cont.).

Animal	Ponto de coleta	Sorovar	Antimicrobianos (Siglas)					
			CIM ($\mu\text{g/mL}$) / Interpretação (S/I/R)					
			Ampicilina AMP	Cefotaxima CTX	Ciprofloxacina CIP	Imipenem IPM	Gentamicina CN	Tetraciclina TE
134	CO	S. Infantis	1,0 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,25 / S	4 / S
135	CO	S. Infantis	2,0 / S	0,25 / S	0,022 / S	0,12 / S	0,50 / S	8 / I
136	CO	S. Infantis	1,5 / S	0,12 / S	0,012 / S	0,19 / S	0,38 / S	6 / I
139	CO	S. Infantis	1,5 / S	0,12 / S	0,012 / S	0,19 / S	0,25 / S	6 / I
140	CO	S. Infantis	1,0 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,25 / S	4 / S
141	CO	S. Infantis	2,0 / S	0,19 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,38 / S	4 / S
143	CO	S. Enteritidis	R	0,06 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,25 / S	R
149	CO	S. Enteritidis	R	0,05 / S	0,022 / S	0,12 / S	0,25 / S	R
159	CO	S. Enteritidis	R	0,03 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,12 / S	R
164	CO	S. Infantis	2,0 / S	0,19 / S	0,015 / S	0,25 / S	0,38 / S	8 / I
171	CO	S. Enteritidis	R	0,06 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,19 / S	R
177	CO	S. Orion	2,0 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,09 / S	0,38 / S	6 / I
184	CO	S. Infantis	1,5 / S	0,12 / S	0,012 / S	0,19 / S	0,50 / S	4 / S
185	CO	S. Infantis	1,0 / S	0,06 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,38 / S	3 / S
21	CA1	S. Panama	2,0 / S	0,09 / S	0,015 / S	0,25 / S	0,50 / S	8 / I
128	CA1	S. Infantis	1,0 / S	0,12 / S	0,012 / S	0,12 / S	0,38 / S	4 / S
129	CA1	S. Infantis	1,5 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,38 / S	4 / S

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfola; CA2- Carcaça após a lavagem; S- Sensível; I- Intermediário; R- Resistente (Continua)

Tabela 5. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados de *Salmonella* spp (cont.).

Animal	Ponto de coleta	Sorovar	Antimicrobianos (Siglas)					
			CIM ($\mu\text{g/mL}$) / Interpretação (S/I/R)					
			Ampicilina AMP	Cefotaxima CTX	Ciprofloxacina CIP	Imipenem IPM	Gentamicina CN	Tetraciclina TE
165	CA1	S. Infantis	2,0 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,50 / S	6 / I
176	CA1	S. Enteritidis	1,0 / S	0,05 / S	0,015 / S	0,25 / S	0,25 / S	4 / S
180	CA1	S. Muenster	1,5 / S	0,12 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,50 / S	8 / I
181	CA1	S. Infantis	2,0 / S	0,19 / S	0,015 / S	0,12 / S	0,50 / S	8 / I
24	CA2	S. Newport	3,0 / S	0,09 / S	0,008 / S	0,12 / S	0,38 / S	4 / S
129	CA2	S. Infantis	1,5 / S	0,09 / S	0,012 / S	0,25 / S	0,50 / S	4 / S
130	CA2	S. Infantis	2,0 / S	0,25 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,50 / S	6 / I
138	CA2	S. Infantis	2,0 / S	0,25 / S	0,022 / S	0,19 / S	0,50 / S	6 / I
140	CA2	S. Infantis	2,0 / S	0,25 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,38 / S	8 / I
178	CA2	S. Enteritidis	R	0,06 / S	0,015 / S	0,19 / S	0,38 / S	R

Legenda: CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfolagem; CA2- Carcaça após a lavagem; S- Sensível; I- Intermediário; R- Resistente

5.4 Perfil de macrorrestrrição por PFGE

A Figura 7 apresenta os resultados da determinação do perfil de macrorrestrrição dos isolados de *Salmonella* spp por PFGE. Empregando-se a enzima de restrição XBal, os 44 isolados analisados foram agrupados em 26 perfis distintos. A maioria dos perfis (24/26 = 92,3%) foi constituída por apenas um único ou dois isolados. Apenas dois perfis apresentaram mais de dois isolados: perfil 7, com seis isolados e perfil 15, com oito isolados. Nenhum dos isolados pertenceu ao perfil 12, constituído pela cepa controle (*S. Braenderup*).

Os isolados de *Salmonella* obtidos no único animal que foi positivo nos três pontos amostrados (animal 129), além de pertencerem ao sorovar *S. Infantis*, pertenceram ao mesmo perfil de macrorrestrrição (perfil 15). O animal 130, proveniente da mesma fazenda que o animal 129 e amostrado no mesmo dia de coleta, também foi positivo para *S. Infantis* no couro e na carcaça CA2, sendo que ambos isolados pertenceram o mesmo perfil de macrorrestrrição. É possível observar ainda que os isolados de *Salmonella* obtidos do couro dos animais 114, 122, 129 e 130 eram *S. Infantis* e também pertenceram ao perfil 15, com 100% de similaridade, indicando tratar-se de um perfil clonal. Deve ser destacado que os animais (114 e 122) eram provenientes da fazenda O e os animais (129 e 130) eram provenientes da fazenda P e que estes quatros animais foram amostrados em diferentes dias.

Em relação ao Perfil 7, que agrupou seis isolados, verificou-se que os isolados eram provenientes do couro de quatro animais diferentes (animais 135, 136, 139 e 140). Além disso, *Salmonella* spp pertencente a este perfil foi também detectada na carcaça CA2 de dois animais (138 e 140).

5.5 Correlação dos resultados obtidos

As características dos isolados de *Salmonella* spp de acordo com a data de coleta, a procedência do animal, o tipo de criação, o sorovar encontrado e o perfil de macrorrestrrição estão apresentados na Tabela 6.

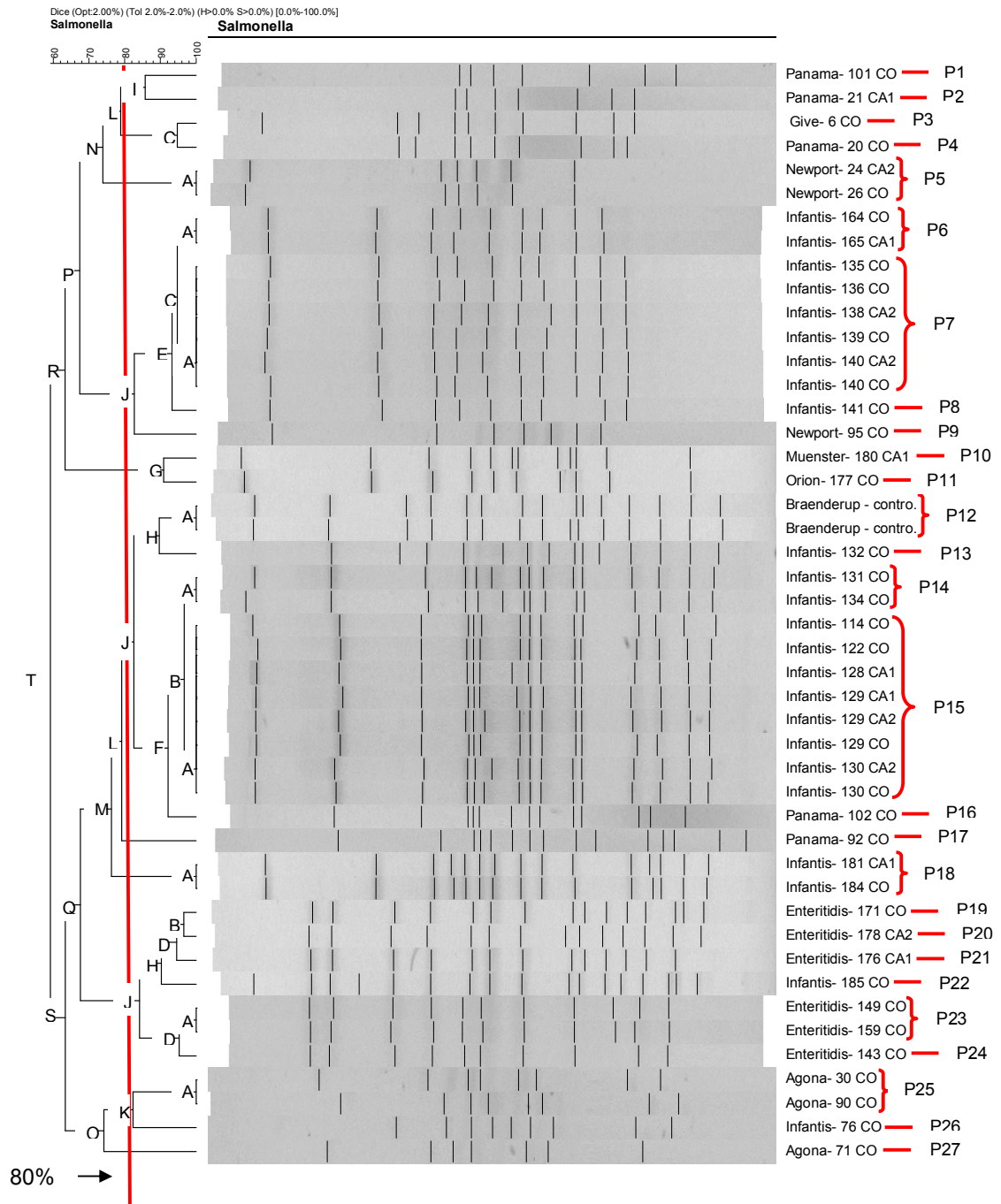


Figura 7- Dendrograma indicando a relação genética entre os isolados de *Salmonella* spp. obtidos no Couro (CO), Carcaca 1 (CA1) e Carcaça 2 (CA2) dos animais amostrados. Legenda: A- 100% de similaridade, B- 96%, C- 95%, D- 94%, E- 93%, F- 91%, G-90%, H- 89%, I- 86%, J- 82%, K- 81%, L- 78%, M- 76%, N-74%, O- 72%, P- 67%, Q- 66%, R- 63%, S- 62% e T- 58%.

Tabela 6- Características dos isolados de *Salmonella* de acordo com a data de coleta, a procedência do animal, o tipo de criação, o sorovar encontrado e o perfil de macrorrestrrição.

Data da coleta	Procedência do animal	Tipo de criação	Nº da amostra / ponto amostrado	Sorovar	Perfil de macrorrestrrição
11/08/2009	Fazenda M – SP	Confinado	101 / CO	S. Panama	P1
10/03/2009	Fazenda C – MS	A campo	21 / CA1	S. Panama	P2
10/02/2009	Fazenda A – MS	A campo	6 / CO	S. Give	P3
10/03/2009	Fazenda C – MS	A campo	20 / CO	S. Panama	P4
10/03/2009	Fazenda D – MS	A campo	24 / CA2	S. Newport	P5
10/03/2009	Fazenda D – MS	A campo	26 / CO	S. Newport	P5
24/11/2009	Fazenda R – SP	Confinado	164 / CO	S. Infantis	P6
24/11/2009	Fazenda R – SP	Confinado	165 / CA1	S. Infantis	P6
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	135 / CO	S. Infantis	P7
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	136 / CO	S. Infantis	P7
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	139 / CO	S. Infantis	P7
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	140 / CO	S. Infantis	P7
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	138 / CA2	S. Infantis	P7
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	140 / CA2	S. Infantis	P7
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	141 / CO	S. Infantis	P8

Legenda: MS- Mato Grosso; SP- São Paulo; CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfola; CA2- Carcaça após a lavagem;

(continua)

Tabela 6- Características dos isolados de *Salmonella* de acordo com a data de coleta, a procedência do animal, o tipo de criação, o sorovar encontrado e o perfil de macrorrestrrição (cont.).

Data da coleta	Procedência do animal	Tipo de criação	Nº da amostra / ponto amostrado	Sorovar	Perfil de macrorrestrrição
11/08/2009	Fazenda M – SP	Confinado	95 / CO	S. Newport	P9
12/01/2010	Fazenda S – MS	A campo	180 / CA1	S.Muenster	P10
12/01/2010	Fazenda S – MS	A campo	177 / CO	S. Orion	P11
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	132 / CO	S. Infantis	P13
14/10/2009	Fazenda P – SP	Confinado	131 / CO	S. Infantis	P14
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	134 / CO	S. Infantis	P14
09/09/2009	Fazenda O – MS	Confinado	114 /CO	S. Infantis	P15
09/09/2009	Fazenda O – MS	Confinado	122 / CO	S. Infantis	P15
14/10/2009	Fazenda P – SP	Confinado	129 / CO	S. Infantis	P15
14/10/2009	Fazenda P – SP	Confinado	130 / CO	S. Infantis	P15
14/10/2009	Fazenda P – SP	Confinado	128 / CA1	S. Infantis	P15
14/10/2009	Fazenda P – SP	Confinado	129 / CA1	S. Infantis	P15
14/10/2009	Fazenda P – SP	Confinado	129 / CA2	S. Infantis	P15
14/10/2009	Fazenda P – SP	Confinado	130 / CA2	S. Infantis	P15

Legenda: MS- Mato Grosso; SP- São Paulo; CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfola; CA2- Carcaça após a lavagem; (continua)

Tabela 6- Características dos isolados de *Salmonella* de acordo com a data de coleta, a procedência do animal, o tipo de criação, o sorovar encontrado e o perfil de macrorrestrrição (cont.).

Data da coleta	Procedência do animal	Tipo de criação	Nº da amostra / ponto amostrado	Sorovar	Perfil de macrorrestrrição
11/08/2009	Fazenda M – SP	Confinado	102 / CO	S. Panama	P16
11/08/2009	Fazenda M – SP	Confinado	92 / CO	S. Panama	P17
12/01/2010	Fazenda S – MS	A campo	184 / CO	S. Infantis	P18
12/01/2010	Fazenda S – MS	A campo	181 / CA1	S. Infantis	P18
12/01/2010	Fazenda S - MS	A campo	171 / CO	S. Enteritidis	P19
12/01/2010	Fazenda S – MS	A campo	178 / CA2	S. Enteritidis	P20
12/01/2010	Fazenda S – MS	A campo	176 / CA1	S. Enteritidis	P21
12/01/2010	Fazenda S – MS	A campo	185 / CO	S. Infantis	P22
24/11/2009	Fazenda R – SP	Confinado	149 / CO	S. Enteritidis	P23
24/11/2009	Fazenda R – SP	Confinado	159 / CO	S. Enteritidis	P23
14/10/2009	Fazenda Q – SP	Confinado	143 / CO	S. Enteritidis	P24
11/08/2009	Fazenda M – SP	Confinado	90 / CO	S. Agona	P25
10/03/2009	Fazenda E – MS	A campo	30 / CO	S. Agona	P25
21/07/2009	Fazenda L – SP	Confinado	76 / CO	S. Infantis	P26
21/07/2009	Fazenda L – SP	Confinado	71 / CO	S. Agona	P27

Legenda: MS- Mato Grosso; SP- São Paulo; CO- Couro; CA1- Carcaça após a esfolagem; CA2- Carcaça após a lavagem;

5.6 Enumeração de *Salmonella* spp

A metodologia utilizada não permitiu a enumeração de *Salmonella* spp em nenhuma das amostras estudadas.

6. DISCUSSÃO

A presença de *Salmonella* spp no couro de bovinos destinados ao abate é de grande importância para a segurança de toda a carne produzida em um abatedouro, pois o couro é uma das principais fontes de contaminação microbiana da carne. Apesar disso, há poucos dados sobre a ocorrência de patógenos no couro de animais destinados a abate no Brasil. A prevalência de *Salmonella* spp encontrada no couro de animais avaliados neste estudo foi de 15,5%, superior à observada por Azevedo (2009), que realizou estudo semelhante no Brasil em 2008, e verificou positividade no couro de apenas 7% dos animais. Em relação a resultados obtido em outros países, os dados obtidos neste estudo são semelhantes aos relatados nos Estados Unidos (15,4%) por Bacon et al (2002), mas bastante inferiores a outros resultados obtidos neste mesmo país, como por exemplo, os 45,3% reportados por Ransom et al. (2002), os 70% relatados por Arthur et al. (2008), os 70,8% relatados por Rivera-Betancourt et al. (2004) e os 91% encontrados por Bosilevac et al. (2009). Ainda nos Estados Unidos, Barkocy-Gallagher et al. (2003), observaram que a prevalência de *Salmonella* spp no couro de bovinos testados em diferentes épocas do ano poderia ser desde 27,7% no inverno até 97,7% no outono. Na Etiópia, Sibhat et al. (2009), detectaram *Salmonella* spp em 31% das amostras de couro estudadas. Na Inglaterra, Reid et al. (2002), pesquisaram a presença de *Salmonella* spp no couro de bovinos e *Salmonella* spp foi encontrada em 10% das amostras analisadas, foram coletadas amostras em quatro diferentes regiões dos animais (lombo, alcatra, flanko e peito) e verificou-se que o peito era a área mais contaminada. Segundo estes autores, a positividade mais elevada de *Salmonella* spp nas amostras do peito em relação às amostras de outras partes do animal pode ser creditada ao contato direto do animal com o solo, quando ele está deitado na fazenda ou nos currais antes do abate.

A prevalência de *Salmonella* spp em carcaças após a esfolagem (3,5%) e em carcaças após a lavagem, antes da refrigeração (3%) se assemelha à outros resultados encontrados no Brasil e também em outros países. Azevedo (2009), no Brasil, verificou a presença de *Salmonella* spp em 2,5% das amostras de carcaças após a esfolagem e em 2% das carcaças após a lavagem, antes da refrigeração. Ghafir et al. (2005), na Bélgica, verificaram *Salmonella* spp em 2,5% nas carcaças analisadas entre 1997 a 1999 e 1,1% naquelas analisadas entre 2000 e 2003. Sibhat

et al. (2009), na Etiópia, obtiveram positividade em 2% das amostras de carcaças estudadas. Ransom et al. (2002), nos Estados Unidos, encontraram *Salmonella* spp em 1,7% das carcaça estudadas. Positividade superior foi encontrada por Rivera-Betancourt et al. (2004), nos Estados Unidos, que detectaram este patógeno em cerca de 25% das carcaças estudadas. As amostras foram coletadas em um abatedouro com um fluxo de abate de 250 a 300 animais por hora e a metodologia utilizada foi diferente da utilizada neste trabalho. McEvoy et al. (2003), no Reino Unido, encontraram *Salmonella* spp em 7,6% das amostras de carcaças coletadas em um abatedouro com um fluxo de abate de 40 a 80 animais por hora. Já Bosilevac et al. (2009), nos Estados Unidos, obtiveram uma positividade ainda maior, ou seja, *Salmonella* spp foi encontrada em 58% das amostras de carcaças coletadas em abatedouros com um fluxo de abate de menos de 1.000 animais por dia. McEvoy et al. (2003) e Bosilevac et al. (2009) utilizaram como metodologia adicional a separação imunomagnética com Dynabeads anti-*Salmonella* antes do enriquecimento seletivo, o que pode ter resultado em maior positividade para *Salmonella* nas carcaças analisadas.

Pelos resultados apresentados na Figura 5, não parece haver uma correlação entre positividade para *Salmonella* spp no couro dos animais e nas carcaças após a esfolagem com a época do ano em que os animais foram analisados. Em outros países, como os Estados Unidos, Barkocy-Gallagher et al. (2003) observaram que a prevalência de *Salmonella* no couro de bovinos foi mais alta nos meses mais quentes (91,6% no verão e 97,7% no outono) do que nos meses com temperaturas mais baixas (27,7% no inverno e 61,4% na primavera). Também Rivera-Betancourt et al. (2004), nos Estados Unidos, observaram que a positividade mais elevada de *Salmonella* spp no couro de 1033 bovinos analisados entre maio e outubro, ocorreu no mês de agosto, ou seja, o mês mais quente do ano. Em relação às carcaças após a esfolagem, Sofos et al. (1999) relataram uma maior prevalência de *Salmonella* spp nas carcaças coletadas nos meses mais quentes. No caso do presente estudo, o número de animais positivos em cada um dos pontos amostrados em relação ao número total de animais estudados foi insuficiente para que uma correlação estatisticamente significativa desta natureza pudesse ser calculada.

Em relação à positividade para *Salmonella* spp de acordo com o tipo de criação do gado (a campo ou em confinamento), verificou-se que entre as amostras

positivas no couro (CO) houve uma maior prevalência de *Salmonella* spp nos animais com sistema de criação tipo confinamento (74%). Um estudo realizado por Barham et al. (2002), nos Estados Unidos, mostrou que a incidência de *Salmonella* spp no couro dos animais criados a campo foi de 6%, e que o confinamento posterior destes mesmos animais por 14 dias aumentou a positividade para 87%, ressaltando desta forma o importante papel do confinamento na disseminação de patógenos entre os animais. Também Fedorka-Cray et al. (1998), nos Estados Unidos, observaram uma maior positividade de *Salmonella* em animais submetidos a confinamento. À medida que o tempo de confinamento aumentava a prevalência de *Salmonella* spp aumentava também: em animais submetidos a poucos dias de confinamento foi observada uma positividade de 3,5%, mas após alguns dias a prevalência aumentou para 7,4%. Beach et al (2002) reportaram que a positividade para *Salmonella* spp em animais na fazenda aumentou de 18,9% para 54,1% após o transporte para o abatedouro.

Considerando que *Salmonella* spp pode persistir por vários dias no ambiente, pode ocorrer a transferência do couro ou pele de um único animal para os demais animais no curral, e também a contaminação do ambiente do abatedouro (estábulo, boxes de confinamento e/ou atordoamento), que pode ser uma forma adicional de transferência do patógeno para animais que entram neste abatedouro (COLLIS et al., 2004; GHAFIR et al., 2005; SMALL et al., 2006; FLUCKEY et al., 2007). Para evitar a transferência de microrganismos do couro para a carcaça durante o processo de abate, a utilização de Boas Práticas de Higiene é, portanto, indispensável.

Em relação aos sorovares dos isolados de *Salmonella* spp, verificou-se a predominância do sorovar S. Infantis (54,5%), seguido dos sorovares S. Enteritidis e S. Panama, presentes em porcentagens mais baixas, 13,6% e 11,4%, respectivamente. A maior ocorrência dos sorovares S. Enteritidis e S. Infantis em produtos cárneos é comum no Brasil e também em outros países. Ghafir et al. (2005) na Bélgica, observaram que 12,5% das cepas de *Salmonella* spp isoladas de carcaças bovinas entre 2000 e 2003 pertenciam ao sorovar S. Enteritidis. No Brasil, Costa (2010) analisou produtos cárneos e encontrou S. Enteritidis em 12,5% das amostras e S. Infantis em 6,2% das amostras, enquanto Rowlands (2008) observou que S. Enteritidis era o sorovar predominante em produtos cárneos coletados no

comércio de São Paulo, mas outros sorovares também estavam presentes. Stevens et al. (2006) no Senegal, verificaram que o sorovar *S. Bredeney* (25,0%) foi o sorovar mais freqüente nas amostras de carne bovina provenientes de abatedouros e varejos, enquanto Fluckey et al. (2007) no Texas, constataram uma prevalência de *S. Muenster* (27,5%) nas amostras de fezes, couro e carcaças de bovinos.

Em relação aos genes de virulência encontrados nos isolados de *Salmonella* spp, outros estudos reportaram uma ocorrência mais elevada destes genes nos isolados obtidos de carnes e produtos cárneos. O gene *invA* foi encontrado por Rowlands (2008), no Brasil, em 100% dos isolados, e também por Skyberg et al. (2006), Olah et al, 2005, Li et al, 2006 e Nde e Logue, 2008, nos Estados Unidos. Além do gene *invA*, Skyberg et al. (2006) observaram que todos os isolados continham também os genes *sitC*, *spaN* e *msgA* e em 90% dos isolados foi encontrado o gene *sifA*.

A resistência a antimicrobianos detectada nos isolados de *Salmonella* spp foi baixa (Tabela 5), visto que todos os isolados foram sensíveis à quatro dos seis antibióticos estudados (cefotaxima, ciprofloxacina, imipenem e gentamicina) e apenas 5 (11,4%) isolados foram resistentes à ampicilina e à tetraciclina. Entre os isolados testados, 23 (52,3%) apresentaram perfil de resistência intermediária à tetraciclina.

Alguns relatos brasileiros mostram taxas de resistência semelhantes às detectadas no presente estudo. Rowlands (2008) verificou que todos os 237 isolados de *Salmonella* spp obtidos de produtos cárneos foram sensíveis à ciprofloxacina, imipenem e cefotaxima, sensibilidade que também foi observada no presente estudo. Igualmente, Azevedo (2009), que testou o perfil de sensibilidade a antimicrobianos de isolados de *Salmonella* spp obtidos no mesmo abatedouro de bovinos do presente estudo, verificou que todos eram também eram sensíveis à gentamicina e tetraciclina e que 4,0% eram resistentes à ampicilina.

Em relação a isolados obtidos em outros países, verifica-se que a resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp é bastante variável. Small et al. (2006), na Inglaterra, avaliaram 137 cepas de *Salmonella* spp isoladas do meio ambiente e de carcaças de carne vermelha processadas em abatedouros de pequeno, médio e

grande porte e verificaram que 8% das cepas foram resistentes à tetraciclina. Já Khaita et al. (2007), nos Estados Unidos, verificaram resistência à gentamicina em 9,0% das cepas testadas. Davis et al. (2007), nos Estados Unidos, relataram que 36,8% das cepas de *Salmonella* Dublin isoladas de bovinos foram resistentes a ampicilina, 31,6% resistentes a tetraciclina e 10,5% resistentes a gentamicina. Além da localização geográfica, diversos outros fatores devem ser considerados na comparação dos resultados com aqueles relatados por outros autores, como diferenças no método de isolamento das cepas, período avaliado, drogas antimicrobianas utilizadas, técnicas empregadas para determinação da susceptibilidade antimicrobiana, os sorovares das cepas envolvidas, a prática de manejo dos bovinos, idade dos animais e dieta alimentar (DARGATZ et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2005). Segundo Su et al. (2004), as taxas de resistência a antimicrobianos variam de acordo com o sorovar de *Salmonella* spp, sendo *S. Enteritidis* relativamente mais susceptível e *S. Typhimurium* o mais resistente. No presente estudo, todos os isolados resistentes à ampicilina e à tetraciclina pertenciam ao sorovar *S. Enteritidis*.

Conforme apresentado na Figura 7, a determinação do perfil de macrorrestrição dos isolados de *Salmonella* spp por PFGE, empregando-se a enzima de restrição XbaI, mostrou uma grande diversidade genética entre estes isolados, já que os 44 isolados analisados pertenciam a 26 perfis distintos. A maioria dos perfis foi constituída por apenas um único ou dois isolados e apenas dois perfis apresentaram mais de um isolado, sendo o perfil 15 constituído por 8 isolados e o perfil 7 por 6 isolados. Os dois perfis foram constituídos apenas por salmonelas do sorovar *S. Infantis*.

Os isolados de *Salmonella* obtidos no único animal que foi positivo nos três pontos amostrados (animal 129), além de serem do mesmo sorovar (*S. Infantis*), apresentaram o mesmo perfil de macrorrestrição (perfil 15), sugerindo que a contaminação detectada na carcaça deste animal nos pontos CA1 e CA2 era proveniente do couro do próprio animal, ou seja, a fonte da contaminação não foi o ambiente do abatedouro. Provavelmente ocorreu o mesmo com o animal 130, que foi positivo no Couro e na carcaça no ponto CA2. A não detecção de *S. Infantis* no ponto CA1 pode ter sido devido a uma falha na metodologia analítica de pesquisa de *Salmonella* spp. A detecção de *S. Infantis* na carcaça CA1 do animal 128, que foi

negativo no couro e também na carcaça CA2, pode ser devida a uma contaminação cruzada durante o processo de abate, na etapa da esfolagem.

Foi observado ainda que os isolados de *S. Infantis* obtidos do couro dos animais 114, 122, 129 e 130 pertenceram ao mesmo perfil de macrorrestrição (Perfil 15), com 100% de similaridade, indicando tratar-se de um perfil clonal. Curiosamente, estes animais eram provenientes de duas fazendas diferentes (O e P), localizadas em estados diferentes (MG e SP) e haviam sido amostrados em datas diferentes (09/09/2009 e 14/10/2010), o que permite concluir que este clone pode estar presente em diferentes fazendas.

Em relação aos sete isolados agrupados no Perfil 7, verificou-se que eram todos provenientes do couro de quatro animais diferentes (animais 135, 136, 139 e 140), provenientes da mesma fazenda (Fazenda Q), sugerindo que este clone de *S. Infantis* esteja circulando nesta fazenda. *S. Infantis* pertencente a este perfil foi detectado também na carcaça CA2 de dois animais (138 e 140), sugerindo uma contaminação durante o processo de abate, já que um destes animais (animal 138) estava negativo para *Salmonella* spp no couro.

A exiguidade de estudos sobre tipagem molecular de *Salmonella* spp isolada da cadeia produtiva de carne bovina dificulta a discussão dos resultados obtidos. No único estudo encontrado, de Stevens et al, 2008, envolvendo carne bovina amostrada em abatedouros e no comércio de Dakar, Senegal, os autores submeteram 76 isolados de *Salmonella enterica* à PFGE, verificando que podiam ser agrupados em 17 genótipos diferentes, ou seja, apresentavam grande diversidade genética, tal como observado no presente estudo.

A análise da tabela 6, que correlaciona os resultados de positividade para *Salmonella* spp de acordo com a procedência do animal, do tipo de criação, do ponto amostrado, do sorovar detectado e do perfil de macrorrestrição ao qual o isolado pertence, juntamente com todos os demais resultados obtidos neste trabalho, permite verificar a ocorrência de contaminação cruzada durante o processo de abate, reforçando a necessidade da adoção de Boas Práticas de Higiene para evitar a disseminação do patógeno na cadeia de produção da carne bovina.

7. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que:

✚ A positividade para *Salmonella* spp nas amostras analisadas foi baixa. Entre as amostras positivas, verificou-se que a positividade no couro dos animais foi maior do que nos outros dois pontos de amostragem (carcaça após a esfolagem e carcaça após a lavagem, antes da refrigeração). Estes resultados indicam que *Salmonella* spp está presente no abatedouro estudado, e que apesar da baixa positividade, Boas Práticas de Higiene são necessárias para evitar a disseminação do patógeno na cadeia de produção da carne bovina.

✚ Os isolados de *Salmonella* spp obtidos nos animais apresentaram pelo menos dois dos fatores de virulência investigados, sendo que 59,1% dos isolados apresentaram todos os genes pesquisados, evidenciando seu potencial patogênico.

✚ A frequência de isolados resistentes a antibióticos foi baixa. De acordo com a metodologia utilizada (M.I.C Evaluator - Oxoid), todos os isolados foram sensíveis a cefotaxima, ciprofloxacina, imipenem e gentamicina, enquanto 11,4% foram resistentes à ampicilina e à tetraciclina e 54,5% apresentaram resistência intermediária à tetraciclina.

✚ O perfil de macrorrestrição, feito por PFGE, indicou uma grande diversidade genética entre os isolados, visto que 44 isolados pertenceram a 26 perfis distintos, sendo que maioria dos perfis (92,3%) foi constituída por apenas um ou dois isolados e apenas dois perfis apresentaram mais de um isolado.

✚ A ocorrência de isolados de *Salmonella* spp pertencentes ao mesmo sorovar e ao mesmo perfil de macrorrestrição no couro de animais e também nas carcaças CA1 e CA2 indica possível contaminação cruzada durante o processo de abate, reforçando a necessidade da adoção de Boas Práticas de Higiene para evitar a disseminação do patógeno na cadeia de produção da carne bovina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABO, S.; RASMUSSEN, O.F.; ROSSEN, L.; SORENSEN, P.D.; OLSEN, J.E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, v.7, p.171-178, 1993.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Exportação de carne bovina no Brasil**. Disponível em : <http://www.abiec.com.br/download/EXP%20JAN%20-%20MAI%2010.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2010

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Pecuária Brasileira**. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_pecuaria.asp Acesso em: 11 jan. 2011a

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Produção e Exportação Mundial de Carne Bovina Brasileira**. Disponível em: http://www.abiec.com.br/download/stat_mercadomundial.pdf Acesso em: 11 jan. 2011b

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Sanidade Animal**. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_sanidade.asp Acesso em: 11 jan. 2011c

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Rebanho Brasileiro**. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp Acesso em: 11 jan. 2011d

ANDREWS, W.; HAMMACK, T.S. Food Sampling and Preparation of Sample Homogenate. In: **FOOD AND DRUG ADMINISTRATION**. Bacteriological Analytical Manual. 8.ed. Gaithersburg: AOAC International, 1998 cap.1.

ARTHUR, T. M.; BOSILEVAC, J. M.; BRICHTA-HARHAY, D. M.; KALCHAVANAND, N.; KING, D. A.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER T. L.; KOOHMARAIE, M. Source tracking of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* contamination in the lairage environment at commercial U.S. beef processing plants and identification of an effective intervention. **Journal of Food Protection**, v. 71(9), p.1752-60, 2008.

AZEVEDO, A.P. **Prevalência e características de *Salmonella* spp em carne bovina brasileira para exportação: contribuição para uma avaliação de risco**. Dissertação de Mestrado, 84p, 2009. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ciências dos Alimentos.

BACON, R.T.; SOFOS, J.N.; BELK, K.E.; HYATT, D.R.; SMITH, G.C. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* isolated from beef animal hides and carcasses. **Journal of Food Protection**, v.65, n.2, p.284-90, 2002.

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.

- BARHAM, A.R.; BARHAM, B.L.; JOHNSON, A.K.; ALLEN, D.M.; BLATON, J.R.; MILLER, M.F. Effects of the transportation of beef cattle from the feedyard to the packing plant on prevalence levels of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* spp. **Journal of Food Protection**, v.65, n.2, p.280-283, 2002.
- BARKOCY-GALLAGHER, G.A.; ARTHUR, T.M.; RIVERA-BETANCOURT, M.; NOU, X.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Seasonal Prevalence of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and Non-O157 Serotypes, and *Salmonella* in Commercial Beef Processing Plants. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, p.1978-1986, 2003.
- BAÚ, A.C.; CARVALHAL, J.B. ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.303-307, 2001.
- BEACH, J.C.; MURANO, E.A.; ACUFF, G.R. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter. *Journal of Food Protection*, v.65, n.11, p.1687-1693, 2002.
- BESSA, M.C.; MICHAEL, G.B.; CANU, N.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M.; RABSCH, W.; RUBINO, S. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. *Research In Veterinary Science*, v.83, n.3, p.302-10, 2007.
- BEUZÓN, C.R.; SALCEDO, S.P.; HOLDEN, D.W. Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. **Microbiology**, v.148, p.2705-2715, 2002.
- BOSILEVAC, J.M.; ARTHUR, T.M.; BONO, J.L.; BRICHTA-HARHAY, D.M.; KALCHAYANAND, N.; KING, D.A.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KOOHMARAIE, M. Prevalence and Enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in U.S. Abattoirs that Process fewer than 1,000 Head of Cattle per day. **Journal of Food Protection**, v.72, n.6, p.1272-1278, 2009.
- BRASIL 1998 – Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, nº 193, de 12 de maio de 1998. **Aprova o Regulamento Técnico para o licenciamento e a renovação de licença de antimicrobianos de uso veterinário, anexo, elaborado pela Secretaria de Defesa Agropecuária**. D.O.U. de 13/05/1998.
- BRASIL 2003 – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. **Proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso da substância química denominada Olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos**. D.O.U. 30/05/2003.
- CARDOSO, M.O.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R.; PILOTTO, F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; ROCHA, S.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.3, p.368-71, 2006.

CARRAMIÑANA, 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.133-9, 2004.

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

CASTANON, J.I. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v.86, n.11, p.2466-71, 2007.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION.. (2010). One-day (24-28h) Standardized **Laboratory Protocol for molecular Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* serotypes, and *Shigella sonnei* by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)**. In: PulseNet section 5.1, 5.2, 5.4, p.1-15.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Salmonella**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html> Acesso em: 09 de março de 2011.

CHIU, C.H.; SU, L.H.; CHU, C. *Salmonella* enterica serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.2, p.311-322, 2004.

CLARK, M.A.; HIRST, B.H.; JEPSON, M.A. Inoculum Composition and *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Regulate M Cell Invasion and Epithelial Destruction by *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity**, v.66, n.2, p.724-731, 1998.

COBURN, B.; SEKIROV, I.; FINLAY, B.B. Type III secretion systems and disease. **Clinical Microbiology**, v.20, n.4, p.535-49, 2007.

CODEX ALIMENTARIUS. 1999. Principles and guidelines for the conduct of Microbiological Risk Assessment, CAC/GL – 30, Roma: **Codex Alimentarius**. Disponível em: www.codexalimentarius.net

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.235-45, 2001.

COLLIS, V.J.; REID, C.A.; HUTCHISON, M.L.; DAVIES, M.H.; WHEELER, K.P.A.; SMALL, A.; BUNCIC, S. **Hide contamination with marker bacteria on beef cattle in a simulated market and at an abattoir. EU-RAIN: farm-to-fork food safety**. The Agricultural University of Athens, 2004.

CORTEZ, A.L.L. **Indicadores de qualidade higiênico-sanitária em lingüiça frescal 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.

COSTA, C.A.R. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* produtora de toxina de Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo.** Dissertação de Mestrado, 112p, 2010. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ciências dos Alimentos.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica (2004). **Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – CVE/SES/SP.** INFORMNET. Apresenta tabelas de surtos de doenças transmitidas por alimentos notificados ao CVE – Estado de São Paulo. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/dta_estat.htm Acesso em: 22 junho de 2008.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R., eds. **Food Microbiology: Fundamentals and Fontiers.** 3.ed. Washington: ASM Press, 2007.

DARGATZ, D.A.; FEDORKA-CRAY, P.J.; LADELY, S.R. AND FERRIS, K.E. Survey of *Salmonella* serotypes in feces of beef cows and their antimicrobial susceptibility patterns. **Journal of Food Protection**, v.63, p.1648-1653, 2000.

DAVIS, M.A.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E.; DANIELS, J.B.; BAKER, K.N.K.; CALL, D.R. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Dublin isolates from beef and dairy sources. **Veterinary Microbiology**, v.119, p.221-230, 2007.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, v.26, p.297-302, 1945.

DOMÍNGUEZ, A.; TORNER, N.; RUIZ, L.; MARTINEZ A.; BARTOLOME, R.; SULLEIRO, E.; TEIXIDO, A.; PLASENCIA, A. Foodborne *Salmonella*-caused outbreaks in Catalonia (Spain), 1990 to 2003. **Journal of Food Protection**, v.70, n.1, p.209-213, 2007.

DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food Microbiology: fundamentals and frontiers.** Washington 2º ed, 2001. 872p.

EDUARDO, M.B.P.; KATSUYA, E.N.; BASSIT, N.P.; MELLO, M.L.R. *Salmonella* Enteritidis – Uma importante causa de surtos bacterianos veiculados por alimentos e a necessidade de uma nova regulamentação sanitária para os alimentos implicados, São Paulo, Brasil, 1999-2003. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v.1, n.8, p. 6-11, 2004.

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.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and

foodborne outbreaks in the European Union in 2005. **The EFSA Journal**. (2005) 130, p. 1-130. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu> Acesso em: 23 jun de 2009.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne. **The EFSA Journal**. (2011) v.9, n.3. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2090.htm> Acesso 9 de março de 2011.

FDA / CFSAN 2008 – FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, CENTER FOR FOOD SAFETY & APPLIED NUTRITION. **Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook. “Bad Bug Book”**. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap1.html>. Acesso em: abril 2008.

FERDOKA-CRAY, P.J.; DARGATZ, D.A.; THOMAS, L.A.; GRAY, J.T. Survey of *Salmonella* serotypes in feedlot cattle. **Journal of Food Protection**, v.61, n.5, p.525-530, 1998.

FERNANDES, S.A.; GHILARDI, A.C.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n.2, p.59-63, 2003.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; DIAS, A.M.; ALMEIDA, I.A.; MELO, L.C. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n.4, p.179-184, 2006.

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

FOLEY, S.L.; ZHAO, S.; WALKER, R.D. Comparison of Molecular Typing Methods for the Differentiation of *Salmonella* Foodborne Pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, p.253-276, 2007.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenic and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v.86, n.14, p.E149-E162, 2008.

FONSECA, E.L.; MYKYTCZUK, O.L.; ASENSI, M.D.; REIS, E.M.; FERRAZ, L.R.; PAULA, F.L.; NG, L.K.; RODRIGUES, D.P. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.8, p.2767-72, 2006.

FORSYTHE, S.J. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, p.162-64, 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: **Bovincultura de Corte**. Piracicaba: FEALQ, vol II, cap.65, p.1305-1320, 2010.

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, R. 3rd. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.86, n.16, p.6383-7, 1989.

GALÁN, J.E.; GINOCCHIO, C. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella* Invasion Gene *invA*: Homology of *invA* to Members of a New Protein Family. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.13, p.4338-4349, 1992.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; DE OLIVEIRA, F.A.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.67, n.6, p.1229-1233, 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 2003. 655p.

GERNER-SMIDT, P.; WHICHARD, J.M. Foodborne disease trends and reports. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.4, n.1, p.1-4, 2007.

GHAFFIR, Y.; CHINA, B.; KORSAK, N.; DIERICK, K.; COLLARD, J. M.; GODARD, C.; ZUTTER, L.; DAUBE, G. Belgian Surveillance Plans To Assess Changes in *Salmonella* Prevalence in Meat at Different Production Stages. **Journal of Food Protection**, v.68, n.11, p.2269-77, 2005.

GHILARDI, A.C.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, n.3, p.281-6, 2006.

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

GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v.130, n. 2, p.77-87, 2009.

HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLENDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v.23, n.6, p.1089-97, 1997.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitária de alimentos**. Varela, São Paulo, 1999. 425p.

HUGHES, C.; GILLESPIE, I.A.; O'BRIEN, S.J. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. **Food Control**, v.18, n.7, p.766-772, 2007.

HUNTER, S.B.; VAUTERIN, P.; LAMBERT-FAIR, M.A.; DUYNE, S.V.; KUBOTA, K.; GRAVES, L.; WRIGLEY, D.; BARRETT, T.; RIBOT, E. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulse-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.3, p.1045-1050, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579**. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp, 4th ed, 2002.

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994-1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1, p.47-51, 1999.

JANAKIRAMAN, A.; SLAUCH, J.M. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v.35, n.5, p.1146-1155, 2000.

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

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

KHAITSA, M.L.; KEGODE, R.B.; BAUER, M.L.; GIBBS, P.S.; LARDY, G.P.; DOETKOTT, D.K. A longitudinal study of *Salmonella* shedding and antimicrobial resistance patterns in north Dakota feedlot cattle. **Journal of Food protection**, v.70, n.2, p.476-481, 2007.

KUBOTA, K.; IWASAKI, E.; INAGAKI, S.; NOKUBO, T.; SAKURAI, Y.; KOMATSU, M.; TOYOFUKU, H.; KASUGA, F.; ANGULO, F.J.; MORIKAWA, K. The human health burden of food borne infections caused by *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Vibrio parahaemolyticus* in Miyagi Prefecture, Japan. **Foodborne Pathogens and disease**, v.5, n.5, p.641-648, 2008.

LI, Q.; SKYBERG, J.A.; FAKHR, M.K.; SHERWOOD, J.S.; NOLAN, L.K.; LOGUE, C.M. Antimicrobial susceptibility and characterization of *Salmonella* isolates from processed bison carcasses. **Applied Environment Microbiology**, v.72, n.4, p.3046-9, 2006.

LUIZ, A.D.F.; MOREIRA, F.C.; CORRÊA, E.D.F.; FALCÃO, DP. Monitoring of the dissemination of *Salmonella* in the chicken Frankfurt-sausage productionline of a sausage factory in the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, p.477-480, 2004.

MARCUS, S.L.; BRUMELL, J.H.; PFEIFER, C.G.; FINLAY, B.B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes Infection**, v.2, n.2, p.145-56, 2000.

MARTINS, L.L.; SANTOS, I.F.; FRANCO, R.M.; OLIVEIRA, L.A.T.; BEZZ, J. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens avàcuo e a granel em supermercados dos municípios do Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.3, p. 215-220, 2008.

McEVOY, J.M.; DOHERTY, A.M.; SHERINDAN, J.J.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL, D.A. The prevalence of *Salmonella* spp in bovine faecal, rumen and carcass samples at a commercial abattoir. **Journal of Applied Microbiology**. v.94, p.693-700, 2003.

MIDURA, T.F.; BRYANT, R.G. Sampling plans, sample collection, shipment, and preparation for analysis. In: **Compendium of Methods for the microbiological examination of foods**. American Public Health Association (APHA), Chap. 2, p.13-23, 2001.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC). **A cadeia produtiva de carnes**. Departamento da Indústrias Intensivas em Mão-de-obra e recursos Naturais. Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/sitio/interna/interna.php?area=2&menu=855>. Acesso em: 6 jun. 2008.

MIRANDA, S.H.G; MOTTA, M.A.D.B. Exportação de carne bovina brasileira: evolução por tipo e destino. **Congresso Brasileiro de Economia e Sociologia Rural** (Sober), 2001.

MUCH, P.; PICHLER, J.; KASPER, S.S.; ALLERBERGER, F. Foodborne outbreaks, Austria 2007. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v.121, n.3/4, p.77-85, 2009.

MÜRMAN, 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.

MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTE, N.L.; HECKERT, R.A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, V.23, Issue 6, p.599-604, 2006.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* spp 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.

NAYAK, R.; STEWART, T.; WANG, R.F.; LIN, J.; CERNIGLIA, C.E.; KENNEY, P.B. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. **International Journal of Food Microbiology**, v.91, n.1, p 51-62, 2004.

- NDE, C.W.; LOGUE, C.M. Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Salmonella* serovars collected at a commercial turkey processing plant. *Journal Applied Microbiology*, v.104, n.1, p.215-23, 2008.
- OLAH, P.A.; SHERWOOD, J.S.; LOGUE, C.M. Molecular analysis of *Salmonella* spp. *Journal of Food Protection*, v.68, n.4, p.845-9, 2005.
- OLSEN, S.J.; BISHOP, R.; BRENNER, F.W.; ROELS, T.H.; BEAN, N.; TAUXE, R.V.; SLUTSKER, L. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotype isolated from humans in the United States, 1987-1997. *Journal Infection Diseases*, v.183, n.5, p.753-61, 2001.
- OLIVEIRA, S.D.; SIQUEIRA, F.F.; DOS SANTOS, L.R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal Food Microbiology**, v.97, n.3, p.297-305, 2005.
- OLIVEIRA, F.A.; BRANDELLI, A.; TONDO, E.C. Atimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **New Microbiology**, v.29, n.1, p.49-54, 2006.
- PARDI, M.C.; et al. **Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação**. Universidade Federal Fluminense. EDUFF – Editora Universitária, 2001. 623p.
- 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 enterica* serovar Typhi CT8. **Nature**, v. 413, n.6858, p.848-52, 2001.
- PENHEITER, K.L.; MATHUR, N.; GILES, D.; FAHLEN, T.; JONES, B.D. Non-invasive *Salmonella* Typhimurium mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. **Molecular Microbiology**, v.24, n.4, p.697-709, 1997.
- PLYM-FORSHELL, L.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.25, n.2, p.541-554, 2006.
- POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L.E. The genus *Salmonella*. In: BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T., eds. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2° ed. New York: Springer, v.2, p.764-799, 2005.
- RAHN, K.; De GRANDIS, S.A.; CLARKE, R.C.; McEWEM, S.A.; GÁLAN, J.E.; GINOCCHIO, C.; CURTISS III, R.; GYLES, C.L. Amplification of an invA sequence of

Salmonella Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.6, p.271-279, 1992.

RANSOM, J.R.; BELK, K.E.; BACON, R.T.; SOFOS, J.N.; SCANGA, J.A.; SMITH, G.C. Comparison of sampling methods for microbiological testing of beef animal rectal/ colonic feces hides and carcasses. **Journal of Food Protection**, v.65, p.621-626, 2002.

REID, C.A.; SMALL, A.; AVERY, S.M.; BUNCIC, S. Presence of food-borne pathogens on cattle hides. **Food Control** v. 13, p.411-415, 2002.

REIJ, M.W., SCHOTHORST, M. Critical notes on microbiological risk assessment of food. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.1-8, 2000.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, 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 carcaças de frango congeladas comercializadas no Estado de São Paulo. **BEPA, Boletim Epidemiológico Paulista**, v.52, p.16-19, 2008.

RIVERA-BETANCOURT, M.; SHACKELFORD, S.D.; ARTHUR, T.M.; WESTMORELAND, K.E.; BELLINGER, G.; ROSSMAN, M.; REAGAN, J.O.; KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. **Journal of Food Protection**, v.67, n.2, p.295-302, 2004.

ROWLANDS, R.E.G. **Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em cepas de *Salmonella* spp isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares**. Dissertação de Mestrado, 96p, 2008. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – Ciências dos Alimentos.

RUIZ, M.; RODRÍGUEZ, J.C.; ESCRIBANO, I.; ROYO, G. Available options in the management of non-typhi *Salmonella*. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, v.5, n.8, p.1737-43, 2004.

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

SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; FLORES, M.L.; PONTES, A.P.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, C.T.P.; LOPES, R.F.F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.29, n.2, p.87-92, 2001.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B. A global perspective on the use, Sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, v.65, n.5, p.725-59, 2006.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004**. Boletim eletrônico ano 05, n. 06, p. 2-7, 2005. Disponível em : http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf. Acesso em: 6 jun. 2008.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE (SVS). **Doenças Transmitidas por Alimentos: Aspectos epidemiológicos 1999-2010**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31760 Acesso em 9 de março de 2011.

SERRANO, M.E.D. Sistemas de adquisición de hierro en *Salmonella enterica*. **Revista Biomedica**, v.20, p.41-54, 2009.

SIBHAT, B.; MOLLA ZEWDE, B.; ZERIHUN, A.; MUCKLE, A.; COLE, L.; BOERLIN, P.; WILKIE, E.; PERETS, A.; MISTRY, K.; GEBREVES, W.A. *Salmonella* Serovars and Antimicrobial Resistance Profiles in Beef Cattle, Slaughterhouse Personnel and Slaughterhouse Environment in Ethiopia. **Zoonoses Public Health**. Dec 23, 2009.

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 drug resistance of *Salmonella* isolates from meat and humans, Denmark. **Emerging Infection Disease**, v.13, n.4, p.638-41, 2007.

SKYBERG, J. A.; LOGUE, C. M.; KOLAN, L.K. 2005. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. **Avian Diseases**. V. 50, N. 1, p. 77-81, 2006.

SMALL, A.; JAMES, C.; JAMES, S.; DAVIES, R.; LIEBANA, E.; HOWELL, M.; HUTCHISON, M.; BUNCIC, S. Presence of *Salmonella* in the red meat abattoir lairage after routine cleansing and disinfection and on carcasses. **Journal of Food Protection**, v.69, n.10, p.2342-51, 2006.

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

SOFOS, J.N.; KOCHEVAR, S.L.; BELLINGER, G.R. Sources an extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United Stated slaughtering plants. **Journal of Food Protection** , v.64, p.140-145, 1999.

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.; CATTEAU, M.; 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, p.191-197, 2008.

SU, L.H.; CHIU, C.H.; CHU, C.; OU, J.T. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. **Clinical Infection Diseases**, v.39, n.4, p.546-51, 2004.

SWARTZ, M.N. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. **Clinical Infection Disease**, v.34, p.111-22, 2002.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.5, p.315-322, 1996.

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

THRELFALL, E.J.; DAY, M.; DE PINNA, E.; CHARLETT, A.; GOODYEAR, K.L. Assessment of factors contributing to changes in the incidence of antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium from humans in England and Wales in 2000, 2002 and 2004. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.28, n.5, p.389-95, 2006.

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

TRAVERS, K.; BARZA, M. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. **Journal Clinical Infectious Diseases**, v.34, p.131-134, 2002.

VAN AMSON, G.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências / surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, p.1139-1145, 2006.

VAN ASTEN, A.J.; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.44, n.3, p.251-259, 2005.

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.

WALLIS, T.S.; GALYOV, E.E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v.36, n.5, p.997-1005, 2000.

WHITE, P.L.; NAUGLE, A.L.; JACKSON, C.R.; FEDORKA-CRAY, P.J.; ROSE, B.E.; PRITCHARD, K.M.; LEVINE, P.; SAINI, P.K.; SCHROEDER, C.M.; DREYFUSS, M.S.; TAN, R.; HOLT, K.G.; HARMAN, J.; BUCHANAN, S. *Salmonella* Enteritidis in meat, poultry and pasteurized egg products regulated by the U.S. Food Safety and Inspection Service, 1998 through 2003. **Journal of Food Protection**, v.70, n.3, p.582-591, 2007.

WINOKUR, P.L.; BRUEGGEMANN, A.; DESALVO, D.L.; HOFFMANN, L.; APLEY, M.D.; UHLENHOPP, E.K.; PFALLER, M.A.; DOERN, G.V. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.44, n.10, p.2777-83, 2000.

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.

ANEXO A

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

2.2 Tempo máximo total de arguição: 3 horas para o mestrado e 5 horas para o doutorado.

3. Não serão permitidas correções na dissertação/tese. Assim, havendo extrema necessidade, poderá ser incluída uma errata.

4. A sessão de defesa será aberta ao público.

5. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

5.1 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5.2 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

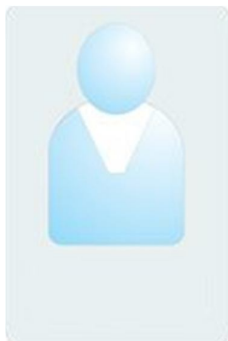
6. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 11 de dezembro de 2009.

Profa. Dra. Bernadette D. G. M. Franco

Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO B



Janaina Thais Lopes

possui graduação em Biomedicina pela Universidade Metodista de São Paulo (2006) e aperfeiçoamento em Tecnologia de alimentos pela Universidade de São Paulo (2008) . Atuando principalmente nos seguintes temas: Salmonella spp, processamento de carne bovina, Resistência antimicrobiana. **(Texto gerado automaticamente pela aplicação CVLattes)**

Última atualização do currículo em 28/04/2011

Endereço para acessar este CV:

<http://lattes.cnpq.br/9135936390575171>



Dados pessoais

Nome	Janaina Thais Lopes
Nome em citações bibliográficas	LOPES, J. T.
Sexo	Feminino
Endereço profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Avenida Professor Lineu Prestes, 580 Bloco 13B 1 Andar 05508-900 - Sao Paulo, SP - Brasil Telefone: (011) 30912191

Formação acadêmica/Titulação

2008	Mestrado em andamento em Ciências dos Alimentos (Conceito CAPES 7) . Universidade de São Paulo, USP, Brasil. <i>Título:</i> Perfil De Susceptibilidade Antimicrobiana E Genes De Virulência De Cepas De Salmonella Spp Isoladas Na, <i>Orientador:</i> Prof ^a . Dr ^a . Bernadete Dora Gombossy de Melo Franco. <i>Bolsista do(a):</i> Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, , . <i>Palavras-chave:</i> Salmonella spp; processamento de carne bovina; Resistência antimicrobiana.
-------------	---

2007 - 2008 Aperfeiçoamento em Tecnologia de alimentos . (Carga Horária: 1120h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: -----. Ano de finalização: 2008.
Bolsista do(a): Fundação Instituto
Pesquisas Farmacêuticas, , .

2004 - 2006 Graduação em Biomedicina .
Universidade Metodista de São Paulo,
UMESP, Brasil.
Título: VACINAS CONTRA O PAPILOMA
VIRUS HUMANO.

Idiomas

Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Espanhol Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente,
Escreve Pouco.

Produção em C,T & A

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ LOPES, J. T. ; LANDGRAF, M. ; DESTRO, M.T. ; FRANCO, B. D. G. M. .
PREVALENCE OF Salmonella spp IN THE PRODUCTION CHAIN OF
BOVINE MEAT FOR EXPORT.. In: XII Congreso Argentino de
Microbiología, 2010, Buenos Aires. XII Congreso Argentino de
Microbiología, 2010.
2. ★ LOPES, J. T. ; LOPES, G. V. ; LANDGRAF, M. ; GUTH, B. E. C. ;
DESTRO, M.T. ; FRANCO, B. D. G. M. . Prevalência e perfil de
susceptibilidade antimicrobiana de Salmonella spp na cadeia de produção de
carne bovina para exportação.. In: 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia,
2009, Porto de galinhas - Pernambuco. Prevalência e perfil de
susceptibilidade antimicrobiana de Salmonella spp na cadeia de produção de
carne bovina para exportação., 2009.
3. ★ LOPES, G. V. ; LOPES, J. T. ; LANDGRAF, M. ; FRANCO, B. D. G. M. ;
DESTRO, M.T. . Ocorrência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de
Campylobacter Termofílico em cortes resfriados de frango do varejo.. In: 25º
Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2009, Porto de galinhas -
Pernambuco. Ocorrência e perfil de sensibilidade antimicrobiana de
Campylobacter Termofílico em cortes resfriados de frango do varejo., 2009.
4. ★ CHIARINI, E. ; AZEVEDO, A. P. ; LOPES, G. V. ; LASCOWSKI, K. M. S. ;

LOPES, J. T. ; FOGO, V. S. ; SIQUEIRA, G. A. ; GUTH, B. E. C. ; LANDGRAF, M. ; DESTRO, M.T. ; FRANCO, B. D. G. M. . Exposure assessment to microbial pathogens in Brazilian bovine hides and carcasses.. In: Advancing Beef Safety through Research and innovation., 2009, Dublin. Proceedings of the ProSafeBeef Meeting at Ashtown Food Research Conference Centre, Teagasc, 2009.

5. ★ BARBOSA, M. S. ; LIMA, K. G. C. ; KRUGER, M. F. ; FURTADO, D.N. ; LOPES, J. T. ; DESTRO, M.T. ; LANDGRAF, M. ; FRANCO, B. D. G. M. . Papel da Temperatura de Incubação e da Concentração de Cisteína na Produção de Bacteriocinas por *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a.. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Em Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia em Brasília no ano de 2007, 2007.
6. ★ BARBOSA, M. S. ; LIMA, K. G. C. ; KRUGER, M. F. ; FURTADO, D.N. ; LOPES, J. T. ; DESTRO, M.T. ; LANDGRAF, M. ; FRANCO, B. D. G. M. . Influência da Extração Ácida na Resistência Térmica e Espectro de Ação de Bacteriocinas Produzidas por *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a.. In: 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2007, Brasília. Em Anais do 24º Congresso Brasileiro de Microbiologia em Brasília no ano de 2007, 2007.

ANEXO C



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 6271571/1 - Janaina Thais Lopes

Email: janaina.thais@usp.br
Data de Nascimento: 10/03/1985
Cédula de Identidade: RG - 297524938 - SP
Local de Nascimento:
Nacionalidade:
Graduação: Bacharel em Biomedicina - Universidade Metodista de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2007

Curso: Mestrado
Programa: Ciência dos Alimentos
Área: Bromatologia
Data de Matrícula: 17/07/2008
Início da Contagem de Prazo: 17/07/2008
Data Limite: 17/01/2011
Orientador: Prof(a). Dr(a). Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco - 17/07/2008 até o presente. E.Mail: bfranco@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 18/06/2010
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Ingressou no Mestrado em 17/07/2008
Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Impresso em: 28/04/11 11:08:33



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9131 - 6271571/1 - Janaina Thais Lopes

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBT5705-1/3	Tecnologia de Produtos Lácteos Funcionais	14/08/2008	07/10/2008	90	6	100	A	N	Concluída
BMM5746-4/1	Controle Microbiológico. Esterilização e Desinfecção	06/10/2008	03/11/2008	60	4	90	A	N	Concluída
FBA5844-1/2	Tópicos em Biotecnologia de Alimentos	24/11/2008	30/11/2008	30	2	100	A	N	Concluída
FBA5886-5/3	Microrganismos Patogênicos em Alimentos I	02/03/2009	12/04/2009	90	6	100	A	N	Concluída
FBA5888-4/1	Microrganismos Patogênicos em Alimentos II	13/04/2009	24/05/2009	90	6	100	A	N	Concluída
BMM5789-4/1	Mecanismos de Ação de Agentes Antimicrobianos	04/05/2009	01/06/2009	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBA5892-4/3	Processos Deteriorantes de Alimentos pelo Desenvolvimento de Microrganismos	18/05/2009	28/06/2009	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5728-2/10	Aprimoramento Didático	21/09/2009	18/10/2009	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	25	25	28
Atividades Programadas:			
Seminários:			
Estágios:			
Total:	25	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 21/02/2011

Impresso em: 28/04/11 11:08:33

