

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS*  
DE FRANCISCO BELTRÃO, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE,  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM  
CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE – NÍVEL MESTRADO

**ANA CAROLINA PEREIRA DA SILVA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA  
DE *Salmonella* spp. ISOLADAS DE CORTES DE FRANGOS**

FRANCISCO BELTRÃO – PR

Março, 2020

**ANA CAROLINA PEREIRA DA SILVA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE  
*Salmonella* spp. ISOLADAS DE CORTES DE FRANGO**

DISSERTAÇÃO apresentado ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas à Saúde – nível Mestrado, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde.

Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientador(a): Dra. Kérley Braga Pereira  
Bento Casaril

FRANCISCO BELTRÃO – PR  
Março, 2020

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Pereira da Silva, Ana Carolina

Isolamento, caracterização e perfil de resistência de *Salmonella* spp. Isoladas de cortes de frango / Ana Carolina Pereira da Silva; orientador(a), Kérley Braga Pereira Bento Casaril, 2020.

71 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Francisco Beltrão, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde, 2020.

1. Antimicrobianos. 2. Microbiota. 3. Microrganismos. 4. Avicultura. I. Casaril, Kérley Braga Pereira Bento. II. Título.

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**ANA CAROLINA PEREIRA DA SILVA**

**ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE  
*Salmonella* spp. ISOLADAS DE CORTES DE FRANGOS**

Essa dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas à Saúde e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e pela Banca Examinadora.

**BANCA EXAMINADORA**

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Kérley Braga Pereira Bento Casaril  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Membro da banca: Prof (a). Dr (a). Léia Carolina Lucio  
Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE

Membro da banca: Prof (a). Dr (a). Volmir Pitt Benedetti  
Universidade Paranaense - UNIPAR

FRANCISCO BELTRÃO, PR  
Março/2020

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde, sabedoria e capacidade para superar as dificuldades e conseguir concluir esta etapa.

Agradeço de forma especial aos meus pais, Sidnei e Maria das Graças, pelo amor incondicional, carinho e orações, essenciais para seguir em frente e a minha irmã Ana Gabriela pela compreensão e palavras de apoio principalmente nos momentos de cansaço.

A minha orientadora, professora Dra Kérley Braga Pereira Bento Casaril, pela competência e ensinamentos partilhados ao longo desse período.

A todo o corpo docente do programa de Pós Graduação em Ciências Aplicadas a Saúde, pelos ensinamentos e conselhos, em especial a coordenadora, professora Léia Carolina Lucio pela dedicação em me ajudar não só nesse trabalho, mas pelo carinho e apoio oferecido em toda a trajetória do mestrado.

Ao professor Volmir Benedetti, que me inspirou a ingressar na pós graduação, por ser exemplo de pesquisador e profissional e por todos os ensinamentos partilhados desde a época da graduação.

As técnicas de laboratório da UNIOESTE, Katiana, Carolina e Elaine e a aluna da iniciação científica, Thalia de Paula, pela ajuda com as análises laboratoriais, essenciais para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus amigos pelos momentos de descontração e por me incentivarem a nunca desistir. Agradeço em especial ao meu namorado, Diego, pela paciência e ajuda no desenvolvimento do trabalho e por sempre estar ao meu lado me fazendo sorrir, principalmente nos dias difíceis.

As minhas colegas de mestrado Angela, Caroline e Juliana, por viverem comigo esse sonho e pela amizade dedicada durante esse período.

E finalmente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal  
PIB – Produto Interno Bruto  
EUA – Estados Unidos da América  
OCEPAR – Organização das Cooperativas Paranaenses  
H<sub>2</sub>S – Ácido Sulfídrico  
pH – Potencial Hidrogeniônico  
DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos  
AMP cíclico – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento  
IN – Instrução Normativa  
SIF – Serviço de Inspeção Federal  
FDA – Food and Drug Administration  
SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária  
PR – Paraná  
SC – Selenito Cistina  
RV – Rappaport –Vassiliadis  
HE – Hektoen Entérico  
XLD – Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio  
BHI – Brain Heart Infusion  
MIO – Motilidade/Indol/ornitina  
TRI – Triptofano  
LAC – Lactose  
GLI – Glicose  
LIS – Lisina  
IND – Indol  
ORN – Ornitina  
MOT – Motilidade  
CIT – Citrato  
RHA – Rhamnose

TSA – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos  
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute  
MH – Mueller Hinton  
ATCC - American Type Culture Collection  
UFC – Unidade Formadora de Colônias  
NAL – Ácido Nalidíxico  
SUT – Sulfazotrim  
AMC – Amoxicilina + Ácido Clavulânico  
AZI – Azitromicina  
CIP – Ciprofloxacina  
GEN – Gentamicina  
AMP – Ampicilina  
IPM – Imipenem  
CFL – Cefalotina  
CFE – Cefalexina  
NIT – Nitrofurantoína  
ESBL – Beta Lactamases de espectro estendido

# ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE *Salmonella* spp. ISOLADAS DE CORTES DE FRANGOS

## Resumo

O frango é a proteína animal mais consumida no Brasil e líder no ranking mundial de exportação deste alimento. Seu elevado consumo se deve ao baixo preço e alto valor nutricional, no entanto, é veículo para microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp. Os agentes antimicrobianos foram utilizados na avicultura durante muitos anos para controlar a proliferação desses microrganismos e essa exposição prolongada favoreceu o surgimento de mecanismos de resistência em cepas de *Salmonella* spp. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi isolar e caracterizar bactérias do gênero *Salmonella* spp. a partir de cortes de frangos comercializados na cidade de Francisco Beltrão – Paraná, e verificar o perfil de resistência dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados na medicina humana. Foram adquiridas 40 amostras de cortes de frango dos supermercados de Francisco Beltrão –PR. As análises microbiológicas seguiram as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e plaqueamento diferencial. As colônias suspeitas foram submetidas a provas bioquímicas realizadas em Kit para identificação de enterobactérias (NEWPROV). Foram selecionadas, quatro colônias de cada amostra com comportamento bioquímico de *Salmonella* spp, totalizando 28 isolados para a realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos. As amostras que apresentaram resistência a ceftriaxona foram submetidas a



pesquisa de beta-lactamases de espectro estendido. Todos os isolados submetidos a teste de sensibilidade a antimicrobianos demonstraram sensibilidade ao meropenem, ao passo que 100% dos isolados foram resistentes ao ácido nalidíxico. Foi observado uma elevada resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos. Foram encontrados 17 perfis diferentes de resistência, sendo que 42,85% apresentaram perfil de multirresistência e 21,42% dos isolados apresentaram fenótipo para produção de Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL). A frequência de lotes contaminados com *Salmonella* spp. de 17,5% em cortes de frangos destinados a comercialização, aponta para a importância de uma adequada cocção e manipulação desses alimentos para a prevenção de surtos de salmonelose. A elevada resistência aos antimicrobianos e seu potencial de disseminação encontrados nesse estudo é um dado preocupante, pois coloca em risco o tratamento de infecções causadas por *Salmonella* spp.

**Palavras-chave:** antimicrobianos, microbiota, microrganismos, avicultura

# ISOLATION, CHARACTERIZATION AND RESISTANCE PROFILE OF *Salmonella* spp. ISOLATED FROM CHICKEN CUTS

## Abstract

Chicken is an animal protein most consumed in Brazil, which is a leader in the world ranking of exports of this food. Its high consumption must be low price and high nutritional value, however, it is a vehicle for pathogenic microorganisms such as *Salmonella* spp. Antimicrobial agents have been used in agriculture for many years to control the proliferation of these microorganisms and this favored prolonged stay or surgery of resistance mechanisms in strains of *Salmonella* spp. Therefore, the aim of the present study was to isolate and characterize *Salmonella* spp. from cuts of chickens marketed in the city of Francisco Beltrão - Paraná and verify the front resistance profile for antimicrobials used in human medicine. 40 samples of chicken cuts were purchased from supermarkets in Francisco Beltrão - PR. The microbiological analyzes followed the stages of pre-enrichment, selective enrichment and differential plating. The suspected colonies were subjected to biochemical tests carried out in a Kit for the identification of enterobacteria (NEWPROV). Four colonies from each sample were selected with *Salmonella* spp. biochemical behavior, totaling 28 isolates, to perform the antimicrobial sensitivity test. Samples that showed resistance to ceftriaxone were subjected to extended spectrum beta lactamases. All isolates subjected to antimicrobial susceptibility testing demonstrated sensitivity to meropenem, whereas 100% of the isolates were resistant to nalidixic acid, a high resistance to beta lactam antimicrobials was also observed. Seventeen different resistance profiles were found, with 42.85% showing a multi-resistance profile and 21.42% of the isolates showing a phenotype for ESBL production. The frequency of batches contaminated with *Salmonella* spp. of 17.5% in chicken cuts destined for commercialization, points to the importance of proper cooking and handling of these foods for the prevention of salmonellosis outbreaks. The high resistance to antimicrobials and their potential for dissemination found in this study is a

worrying fact, as it puts at risk the treatment of infections caused by *Salmonella* spp.

**Keywords:** Antimicrobials, microbiota, microorganisms, poultry

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>12</b>
1.1 Avicultura no Brasil .....	12
1.2 Microrganismos em frangos .....	14
1.3 Características microbiológicas do gênero <i>Salmonella</i> spp. ....	16
1.4 <i>Salmonella</i> spp. como agente de toxinfecções .....	17
1.4.1 Mecanismos de patogenicidade, manifestações clínicas, tratamento, prevenção e controle .....	19
1.5 Uso de antimicrobianos na indústria avícola e disseminação da resistência.....	22
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 Geral .....	26
2.2 Específicos.....	26
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 Coleta das amostras .....	27
3.2 Análises Microbiológicas.....	27
3.2.1 Pesquisa e isolamento de <i>Salmonella</i> spp. ....	27
3.2.2 Provas bioquímicas.....	28
3.3 Confirmação do gênero <i>Salmonella</i> por MALDI-TOF.....	30
3.4 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) .....	30
3.5 Pesquisa fenotípica de ESBL.....	31
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>
<b>5. ARTIGO CIENTÍFICO 01 .....</b>	<b>40</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>60</b>

# 1. INTRODUÇÃO GERAL

## 1.1 Avicultura no Brasil

A avicultura brasileira é uma das mais desenvolvidas do mundo e o Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango desde 2015, atrás apenas dos Estados Unidos e superando países como a China. Mundialmente, no ano de 2017, foram consumidos, aproximadamente 89,9 milhões de toneladas de carne de frango, sendo que, 13,1 milhões de toneladas foram produzidos pelo Brasil (EMBRAPA, 2018).

A produção de carne de frango vem se consolidando no Brasil desde 1940, onde a produção era basicamente artesanal, centrada em pequenas propriedades rurais e comercializada para pequenos açougues. A partir da década de 1970, a produção passou a ganhar escalas industriais, com abatedouros de grandes portes e novas tecnologias, com a finalidade do aprimoramento e da melhoria do produto para produção em larga escala (VOILA, TRICHES, 2015).

Inúmeras mudanças tecnológicas no processo produtivo, resultaram em ganhos significativos na produtividade e possibilitaram o setor alcançar o patamar atual, como o uso de equipamentos de última geração, diminuição do tempo de engorda das aves, uso de rações balanceadas e programas de melhoramento genético como seleção de linhagens, transferência de embriões, inseminação artificial, clonagem e manipulação *in vitro* de embriões. Além de investimentos na estrutura dos aviários para aumentar o bem-estar das aves durante a criação com a finalidade de melhorar o seu desenvolvimento (ESPÍNDOLA, 2012).

De acordo com a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2018), o consumo *per capita* de carne de frango no Brasil, aumentou significativamente nos últimos anos de 37,02 kg por habitante em 2007 para 42,07 kg por habitante em 2017. Esse aumento no consumo também refletiu na produção, que passou de 10,98 milhões de toneladas no ano de 2009 para 13,05 milhões de toneladas no ano de 2017, demonstrando um aumento de 18,85% da produção em apenas

8 anos.

Em relação ao mercado externo, o Brasil lidera o *ranking* dos maiores exportadores do mundo desde o ano de 2004, com participação de aproximadamente 40% do mercado mundial de carne de frango. Em média 66,9% da produção brasileira é destinado ao mercado interno e 33,1% para o mercado externo. Em 2017, o volume total de exportação chegou a 4,3 milhões de toneladas, para mais de 150 países (ARANDA et al., 2017; ABPA, 2018).

Dentre os estados brasileiros, o Paraná lidera o *ranking* de produção de carne de frango, sendo que, no ano de 2017 foi responsável pelo abate de 4,48 milhões de toneladas e exportou 37,2% do total de frango do país (EMBRAPA, 2018; ABPA, 2018). Atualmente, o estado possui 220 cooperativas, que juntas totalizaram um faturamento R\$ 70,6 bilhões no ano de 2017 (OCEPAR, 2018).

Além disso, as cinco primeiras empresas associadas da ABPA de exportação de carne de frango do Brasil, estão instaladas no Paraná, confirmando o excelente aproveitamento do estado. Os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul também se destacam nas exportações, representando 22,95% e 17,58% respectivamente. Juntos, a região Sul, exporta cerca de 77,73% do total de carne de frango produzida no Brasil (ABPA, 2018).

O sistema agroindustrial avícola é de extrema importância para a economia do país, uma vez que emprega direta ou indiretamente, 5% da população, correspondendo a mais de 5 milhões de brasileiros e é responsável por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. Este setor é constituído de dezenas de empresas exportadoras, centenas de empresas beneficiadoras e milhares de produtores integrados (ABPA, 2018).

O setor avícola possui vantagens competitivas no mercado interno e externo pelo fato de possuir um rápido ciclo produtivo e por ser uma proteína de baixo custo, o que atrai consumidores de diferentes níveis socioeconômico (RECK, SCHULTZ, 2016). O consumo de carne de frango no Brasil tem aumentado com o passar dos anos, isso porque muitos brasileiros mudaram seus hábitos alimentares em relação ao consumo de carnes (VOGADO, 2016). De acordo com a ABPA (2018), o consumo *per capita* no ano de 2009 era de 38,47 kg, em 2016 esse valor passou para 42,07 kg, evidenciando um aumento

de 9,35% do consumo por habitante em apenas 7 anos.

O marcante aumento do consumo de carne de frango é caracterizado pela preocupação da população com a saúde, optando por mudanças no hábito alimentar incluindo a substituição de carnes vermelhas por outras carnes como a de frango e de peixes. Além disso, os investimentos em tecnologias, o aumento da fiscalização sanitária e a melhor organização do setor avícola fez com que surgissem novas marcas e produtos mais atrativos, aumentando ainda mais a aceitação dos brasileiros em relação ao consumo dessa carne (VOILA, TRICHES, 2015).

Para assegurar a qualidade do produto que chega à mesa do consumidor, é de fundamental importância a adesão de um sistema de produção adequado e organizado. Para isso, deve ser implementado nas granjas o manual de Boas Práticas de Produção, que recomenda medidas de instalações, manejo e alimentações dos frangos e o manual de Boas Práticas de Fabricação nas indústrias para que seja garantida a segurança e a qualidade desses alimentos (EMBRAPA, 2018).

O consumo da carne de frango é considerado um hábito saudável e nutritivo, pois trata-se de uma fonte importante de proteína de origem animal, além de ser rica em ferro, aminoácidos e vitaminas, especialmente do complexo B, como B<sub>2</sub> e B<sub>12</sub>. No entanto, quando *in natura* pode ser um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, como *Salmonella spp.* (WELKER et al., 2010; DE SALES SOUZA et al., 2016).

## **1.2 Microrganismos em frangos**

Diversos microrganismos, como fungos, protozoários e bactérias habitam o trato gastrointestinal das aves. A microbiota é formada principalmente por bactérias, com predomínio de Gram-negativas, e em menor quantidade por Gram-positivas, refletindo o ambiente de criação, abate e condições de processamento. Esses microrganismos podem estar fixados ao epitélio ou livres na luz intestinal e sua multiplicação ocorre de forma mais rápida que a eliminação pelas fezes (JEURISSEN et al., 2002; GABRIEL et al., 2006).

As bactérias que colonizam o trato gastrointestinal das aves podem ou não serem patogênicas. As não patogênicas auxiliam na estimulação do sistema imunológico, produção de vitaminas, inibição da proliferação de microrganismos patogênicos e facilitam a digestão e absorção de nutrientes. Enquanto, as bactérias patogênicas podem causar infecções promovendo putrefação intestinal, produção de toxinas e redução da digestão e absorção de nutrientes e, se não houver o controle do desenvolvimento da população, essas infecções podem trazer sérios prejuízos para a saúde das aves, que na maioria dos casos é condenada e considerada imprópria para o consumo humano (JEURISSEN et al., 2002).

O equilíbrio da microbiota intestinal pode sofrer alterações devido à alimentação inadequada, estresse, condições higiênicas e sanitárias do ambiente de criação e enfermidades adquiridas pelas aves. Esses fatores podem elevar o desenvolvimento e multiplicação bacteriana competindo por nutrientes da própria ave ou ainda favorecendo o desenvolvimento de determinada comunidade microbiana (APAJALAHTI, 2005).

Diante desse contexto, a carne de frango, pode atuar como vetor de microrganismos causadores de doenças na população humana. A contaminação por essas bactérias também pode ocorrer durante o processamento do alimento, visto que a carne de frango, passa por inúmeros processos até chegar à mesa do consumidor, aumentando a probabilidade de contaminação do alimento e resultando em elevados prejuízos socioeconômicos. Dentre as diversas bactérias patogênicas que podem ser transmitidas pelas aves e causar toxinfecções nos consumidores se destacam *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* e bactérias do grupo coliformes (FRANCO, LANDGRAF 2005; WELKER et al., 2010; SILVA et al., 2016; ZAGONEL et al., 2017).

As bactérias do gênero *Salmonella spp.* são as de maior relevância e importância clínica, pois frequentemente contamina a carne de frango no momento do abate, durante a evisceração, a escaldagem e o pré-resfriamento, uma vez que é oriunda do intestino das aves. No entanto, as Boas Práticas de Fabricação, como o uso adequado do binômio tempo x temperatura podem eliminar a *Salmonella* dos alimentos, pois é facilmente destruída por cocção



acima de 70°C, durante 15 e 20 minutos (LUBER, 2009; ZAGONEL et al., 2017).

Assim, é fundamental que o manipulador de alimentos tenha conhecimento da presença desses microrganismos na carne de frango para evitar a contaminação cruzada com outros alimentos, utensílios de cozinhas e as próprias mãos do manipulador. Existem bactérias capazes de migrar da superfície para o interior da carne, dificultando sua eliminação através do processamento térmico. Além disso, alguns microrganismos presentes em aves denominados psicotróficos, possuem a capacidade de continuar seu desenvolvimento e multiplicação em temperaturas de refrigeração a 7°C. Os gêneros *Listeria*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* são os principais patógenos psicotróficos de importância clínica presentes na carne de frango. Algumas cepas de *Salmonella*, apesar de não possuírem caráter psicotróficos, desenvolveram a capacidade de resistir a baixas temperaturas (GABRIEL et al., 2006).

### **1.3 Características microbiológicas do gênero *Salmonella* spp.**

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos pertencentes à família das Enterobacteriaceae, móveis, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos. Bioquimicamente as espécies do gênero *Salmonella* são produtores de H<sub>2</sub>S, catalase positiva, não fermentadores de lactose, oxidase negativo e possuem a capacidade de descarboxilar aminoácidos como ornitina e lisina. Conseguem se desenvolver e se multiplicar em pH neutro, próximo de 7,0. Logo, meios extremamente ácidos ou básicos com pH inferior a 4,0 ou superior a 9,0 e de concentração salina maior que 9%, tornam-se bactericida para esse microrganismo. A atividade de água mínima para seu crescimento é de 0,94 e a temperatura de multiplicação varia de 5°C e 47°C, sendo a ótima entre 35 a 37°C. Temperaturas superiores a 60°C destroem as células bacterianas, enquanto temperaturas baixas, de congelamento, apenas inibem seu desenvolvimento e multiplicação, não provocando a morte da célula. Podem ser encontradas no ambiente e colonizam, naturalmente, o trato gastrointestinal de humanos e animais, com maior frequência em aves, suínos e

bovinos, mas também podem causar infecções, sendo reconhecido como o patógeno mais comum na avicultura (FRANCO; LANDGRAF, 2005; KONEMAN et al., 2008, TEIXEIRA, LIMA, 2008).

O gênero *Salmonella* possui duas espécies geneticamente distintas: *Salmonella bongori*, isolada de animais de sangue frio e *Salmonella enterica*, que possui seis subespécies e contém mais de 2.579 sorotipos. Dentre estes, 1.531 pertencem à subespécie enterica (TINDALL et al., 2005). No Brasil, os sorotipos mais frequentes em aves são: Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Agona e Mbandaka. Em outras subespécies e para a espécie *S. bongori*, a divisão em sorovares ocorre por meio da caracterização de seus antígenos somáticos (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (TINDALL et al., 2005; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A classificação das subespécies do gênero *Salmonella*, começou em 1926, pelos cientistas White e Kauffman, posteriormente, em 1930, os trabalhos desenvolvidos por esses dois cientistas deram origem ao esquema de Kauffman e White, amplamente utilizado nos dias atuais e que propõe a divisão de subespécies de microrganismos em sorogrupos ou sorovares de acordo com a presença de seus antígenos (BRENNER, 2010; GUIBOURDENCHE et al., 2010; DE JONG et al., 2012).

Os antígenos somáticos, são essenciais para a virulência bacteriana, são compostos por fosfolipídeos e polissacarídeos, garantindo resistência a ácido, álcool e temperaturas elevadas. Os antígenos flagelares estão presentes na estrutura de locomoção bacteriana e os flagelos são termolábeis por serem constituídos de proteínas. Alguns sorovares como *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi* e algumas cepas de *Salmonella Dublin*, além de antígenos somáticos e flagelares, também possuem antígeno capsulares conferindo-lhes resistência e proteção (CAFFER, TERRAGNO, 2001; TINDALL et al., 2005; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

#### **1.4 *Salmonella* spp. como agente de toxinfecções**

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. é um dos microrganismos mais

envolvidos em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Faz parte da microbiota das aves, mas também possui a capacidade de causar infecções graves em animais e humanos com inúmeros sorovares potencialmente patogênicos já identificados (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A salmonelose, doença causada por bactérias do gênero *Salmonella*, se tornou um problema de saúde pública devido ao seu elevado potencial de disseminação. Vários surtos diretamente envolvendo a carne de frango já foram registrados (AMSON, HARACEMIV, MASSON, 2006; KOTTWITZ et al., 2010; BRASIL, 2018). A contaminação da carne de frango pode ocorrer desde o momento da eclosão do ovo até o seu abate e manipulação. A principal via para a bactéria entrar em contato com a carne é através do manipulador e dos materiais utilizados para o abate e o manejo do animal, demonstrando déficit de higiene nos processos da cadeia produtiva (FRANCO, LANDGRAF 2005; LUBER, 2009; VOSS-RECH, 2015).

A doença pode ser causada por diversos sorotipos da bactéria, no entanto, no Brasil, *S. Enteritidis* é o agente mais comumente encontrado, correspondendo a 99% das salmoneloses humanas, seguida por *S. Typhimurium* e *S. Paratyphi*, sendo essas duas últimas, específicas para seres humanos, não causando infecções em animais (FARDSANEI et al., 2017; REYES et al., 2017).

A principal forma de transmissão da *Salmonella* para humanos é por meio da ingestão de alimentos contaminados com a bactéria, que muitas vezes são preparados e armazenados de forma incorreta, o que facilita a multiplicação e o desenvolvimento de cepas patogênicas, além de aumentar a dose ingerida. Os principais alimentos envolvidos com a transmissão da salmonelose são as carnes de aves, suínas, ovos e leites (CANGEN, 2011).

A via fecal-oral é outra importante forma de transmissão, pois *Salmonella* é eliminada pelas fezes de humanos e de animais infectados e a sobrevivência da bactéria nas fezes pode ser longa, principalmente nas fezes secas utilizadas como esterco e adubo. Em esterco bovino, esse microrganismo pode ficar viável para causar novas infecções por até 30 meses e em fezes de aves, pode resistir por 28 meses. No ambiente, há relatos de estirpes resistindo até 280 dias em

solo cultivado e 120 dias em pastagens. Além de serem encontradas em efluentes de água proveniente da contaminação com material de origem fecal (HIRSH, ZEE, 2003; TEPLITSKI, AL-AGELY, AHMER, 2006; BRASIL, 2011; CARVALHO et al., 2016).

O contato direto com animais infectados com a bactéria, ausência de saneamento básico e o tratamento não adequado do esterco e esgoto, também são importantes fontes de contaminação para a população humana. Geralmente, a dose infectante varia em torno de  $10^5$  a  $10^8$  células viáveis da bactéria, no entanto, em pacientes imunocomprometidos, a dose infectante cai para números inferiores a  $10^3$  células (ZAGONEL et al., 2017).

#### **1.4.1 Mecanismos de patogenicidade, manifestações clínicas, tratamento, prevenção e controle**

A patogenicidade varia de acordo com o sorotipo da *Salmonella* e as condições do hospedeiro tais como, idade, imunidade e presença de outras patologias associadas. De acordo com o sorotipo, as infecções e toxinfecções podem apresentar-se na forma de gastroenterites leves até infecções sistêmicas graves. Sendo assim, a doença apresenta três classificações: a febre tifoide, causada pela *S. Typhi*, a febre entérica causada por *S. Paratyphi* e as enterocolites ou salmoneloses causadas pelos demais sorovares de *Salmonella* (OLIVEIRA et al., 2013; MONTEZANI et al., 2018).

Durante o processo de infecção, a bactéria encontra inúmeros ambientes hostis, além de precisar sobreviver a ação do sistema imunológico do hospedeiro. Vários fatores de virulência são necessários para que a bactéria consiga invadir, colonizar, multiplicar e sobreviver no hospedeiro e causar infecções (VIEIRA, 2009).

Inicialmente, *Salmonella* precisa ter a capacidade de aderir às células do hospedeiro e a presença de fímbrias é fundamental para esse processo. A partir da adesão, haverá invasão e colonização das células intestinais. Para isso, são necessários genes *inv*, responsáveis por promover ondulações, denominada *ruffles*, na superfície da célula a ser infectada, permitindo a internalização da

bactéria. Duas toxinas, também são produzidas durante o processo de invasão celular, uma termolábil e outra termoestável, sendo este, um importante mecanismo de virulência expresso pela bactéria para causar a doença (GIBSON et al., 2006; VIEIRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2013).

Nas enterocolites, o microrganismo ingerido passa pelo estômago e se multiplica nas células epiteliais da região ileocecal, posteriormente, penetra no epitélio e infecta fagócitos, gerando resposta inflamatória com liberação de prostaglandinas e estimulação de AMP cíclico. Esse processo leva a um aumento da secreção de água, fluidos e eletrólitos que irá desencadear o quadro diarreico (CARVALHO et al., 2016).

As manifestações clínicas das enterocolites restringem-se a casos mais brandos que envolvem cefaleias, febre, calafrios, náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia. O início dos sintomas ocorre de 6 a 72 horas após a ingestão do microrganismo, normalmente a doença é autolimitante e os sintomas persistem por 2 a 3 dias. A recuperação completa ocorre após dias ou semanas, e esse prazo pode variar dependendo da dose infectante e das características do hospedeiro. Em idosos, enfermos e lactentes o risco aumenta e esse período geralmente é maior. Mesmo após o desaparecimento de todos os sintomas, muitos pacientes continuam a eliminar a bactéria pelas fezes, disseminando-a por até seis meses (TORTORA et al., 2012; SILVA et al., 2016).

Nas infecções sistêmicas como a febre tifoide e febre entérica, a bactéria infecta os linfonodos mesentéricos e o utilizam como veículo para sua disseminação para outros órgãos e tecidos. Inicialmente os principais órgãos atingidos são fígado e baço, posteriormente pode acometer outros através da corrente sanguínea (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A febre tifoide apresenta sintomas graves que incluem septicemia, febre alta e contínua, cefaleia, diarreia, náuseas, vômitos e anorexia, podendo evoluir para óbito. O quadro diarreico pode variar de diarreia aquosa a sanguinolenta e com muco. Em alguns casos, ocorre o desenvolvimento da síndrome do cólon irritado, caracterizada por diarreia branda persistente, seguida de quadro agudo de gastroenterite. A duração da doença pode chegar a dois meses, sendo o período de incubação de 7 a 21 dias (BRASIL, 2011; DE JONG et al., 2012).

O quadro clínico da febre entérica é mais brando quando comparados aos sintomas da febre tifoide, contudo, também podem levar a quadros de septicemia. Após a infecção, assim como nas enterocolites, alguns indivíduos se tornam portadores assintomáticos e continuam disseminando a infecção por meses e até anos. A taxa de mortalidade por febre tifoide e entérica em geral é baixa, aumentando em pacientes idosos e lactentes, nesses casos o óbito geralmente ocorre por choque séptico (SHINOHARA et al., 2008; DE JONG et al., 2012).

A maioria das infecções causadas por sorotipos do gênero *Salmonella* é autolimitante e os sinais e sintomas desaparecem em até 48 horas, nesses casos, a terapia antimicrobiana não é indicada, uma vez que prolonga o período de excreção do agente pelas fezes e favorece o surgimento de cepas resistentes da bactéria. Nos casos de febre tifoide e de febre entérica, recomenda-se que o tratamento com agentes antimicrobianos seja iniciado o quanto antes. Esse tratamento deve ser mantido por pelo menos uma semana após o indivíduo não apresentar mais quadros febris. Com a introdução dos antimicrobianos na prática terapêutica, os índices de mortalidade por infecções causadas por *Salmonella* caíram de 15% para menos de 1% (SHINOHARA et al., 2008).

Medidas de controle e monitorização em todas as etapas da produção, desde o ambiente de criação até a manipulação do alimento nas residências e cozinhas industriais são fundamentais para a prevenção das enfermidades causadas por bactérias do gênero *Salmonella*. O manuseio correto e seguro da carne crua, bom cozimento e higiene adequada na cozinha podem prevenir ou reduzir o risco apresentado pelo alimento contaminado (EFSA, 2014; WHO, 2015).

Regulamentos e leis nacionais e internacionais preconizam normas para controlar a presença de microrganismos em alimentos de origem animal e evitar sua disseminação. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), estabeleceu através da Instrução Normativa (IN) nº 20, de 2016, monitoramento e controle de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos comerciais de frango de corte e perus e nos locais de abate de aves registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), objetivando reduzir a contaminação por esse

patógeno e garantir proteção e qualidade ao consumidor (BRASIL, 2016).

### **1.5 Uso de antimicrobianos na indústria avícola e disseminação da resistência**

O sucesso da produtividade do setor avícola está diretamente relacionado à saúde intestinal dos frangos, no entanto, a produção e criação intensiva aumentou a probabilidade de as aves adquirirem enfermidades relacionadas ao desequilíbrio da microbiota, deixando clara a necessidade da utilização de medicamentos para restaurar a saúde intestinal e promover o crescimento saudável das aves. Nesse sentido, os agentes antimicrobianos, são amplamente utilizados no setor avícola (BARROS et al., 2012; OLEFORUH-OKOLEH et al., 2015).

Os antimicrobianos são fármacos cuja principal função é ocasionar a morte ou inibição do desenvolvimento de microrganismos. Esses agentes podem ter como mecanismos de ação a parede celular, a membrana citoplasmática, a síntese de ácidos nucleicos, a síntese de proteínas e as vias metabólicas, de modo a inibir ou prejudicar o funcionamento e estrutura da célula bacteriana (RIBEIRO et al., 2008; TORTORA et al., 2012).

Na produção animal, os antimicrobianos são utilizados para controle e tratamento de doenças infecciosas, promoção do crescimento e profilaxia, uma vez que promovem a modulação benéfica da microbiota e reduzem a produção de toxinas bacterianas e demais compostos tóxicos, melhorando e aumentando a produtividade com conseqüente diminuição da mortalidade (PELICANO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2008).

A introdução dos agentes antimicrobianos em rações de frangos foi descrita pela primeira vez em 1949, no qual foi observado que linhagens de frango alimentados com resíduos de tetraciclina, cresciam e se desenvolviam mais rapidamente que o grupo controle que não recebeu tetraciclina em sua alimentação (ZHAO, DONG, WANG 2010; MODI et al., 2011; WEI et al., 2011).

De acordo com relatório gerado pela *US Food and Drug Administration* (FDA) quantidades abundantes de antimicrobianos foram utilizados em áreas de

produção animal. No ano de 2013, mais de 14 mil toneladas de antimicrobianos foram destinados para uso em animais, desses as tetraciclinas lideram o *ranking* dos fármacos mais administrados, correspondendo a 5 mil toneladas, seguida das sulfonamidas estimada em pouco mais de 90 toneladas (FDA, 2015).

A utilização em excesso dos antimicrobianos na produção avícola, contribuiu para o surgimento de bactérias resistentes, sendo uma das prováveis causas da emergência de cepas de *Salmonella* resistentes. A pressão seletiva ocasionada pela exposição prolongada a essas substâncias em doses subterapêuticas, favorece o desenvolvimento de mecanismos de resistência expressos pelas bactérias, principalmente, à tetraciclinas e à estreptomicinas. Em relação a *Salmonella* spp., estudos demonstram que 51% dos sorotipos apresentam resistência a pelo menos um antimicrobiano utilizado na prática clínica humana (DIARRA, MALOUIN, 2014; PANDINI et al., 2014).

A resistência adquirida, devido ao uso abusivo de antimicrobianos no setor avícola, por cepas de *Salmonella* e outras bactérias presentes no frango se tornou causa de preocupação mundial. Considerando que essas aves são destinadas a alimentação humana, existe a possibilidade dessas bactérias, bem como seus genes de resistência, serem transferidos e incorporados a microbiota humana tornando-as resistentes (STANTON, 2013; CHANTZIARAS et al., 2014; GARCIA-MIGURA et al., 2014; VAN BOECKEL et al. 2015).

A transferência da resistência para a microbiota humana através da alimentação foi relatada pela primeira vez em 1975. No estudo foi constatado que a utilização de clorotetraciclina como promotor de crescimento favoreceu o surgimento de cepas resistentes de *Escherichia coli* nos frangos. Essa mesma resistência também foi observada nos microrganismos do trato gastrointestinal da família que habitava a fazenda que cuidava e consumia as aves (ROLAIN, 2013).

Diversos autores afirmam que as bactérias e seus genes de resistência presentes na carne de frango podem ser incorporados a microbiota humana. Esses genes, na maioria das vezes, estão localizados em elementos móveis como plasmídeos e *transposons*, sendo possível a transferência horizontal dos genes de uma bactéria para a outra, caracterizando um elevado potencial de



disseminação. Além disso, por meio de análises moleculares, já foi demonstrado que elementos idênticos em sua composição são encontrados em animais e humanos e em bactérias patogênicas, oportunistas e comensais. Sendo assim, a existência de cepas resistentes em animais destinados ao consumo humano se torna uma ameaça a eficácia terapêutica dos antimicrobianos na prática clínica (TEUBER, 2001; GUIMARÃES et al., 2010; ARIAS, DE MAIO CARRILHO, 2012).

Em consequência disso, alguns países, como os da União Europeia, baniram o uso de antimicrobianos como agentes de crescimento e melhoradores de desempenho na criação de animais. Com isso, houve um crescente interesse na busca de alternativas que sejam eficientes e viáveis ao mesmo tempo (SANTANA et al., 2011). No Brasil, o MAPA é o órgão que realiza a fiscalização do uso de aditivos na alimentação animal pela Lei 6.198, de 26/12/1974 regulamentada pelo Decreto 6.296, de 11/12/2007, que proíbe a utilização de avoparcina (Ofício Circular DFPA nº 047/1998), cloranfenicol e nitrofuranos (IN 9, 27/06/2003), carbadox (IN 35, 14/11/2005), anfenicóis, tetraciclina, beta-lactâmicos quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (IN 26, 9/07/2009, revoga Portaria 193/1998), espiramicina e eritromicina (IN 14, 17/05/2012) (BRASIL, 2017).

Até o ano de 2013, era permitido no Brasil, a utilização de alguns antimicrobianos na alimentação de frangos incluindo avilamicina, bacitracina metileno disalicilato, bacitracina de zinco, sulfato de colistina, cloridrato de clorexidina, enramicina, flavomicina, halquinol, lincomicina, tilosina e virginiamicina (BRASIL, 2017). No entanto, no final de 2018, a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), ligada ao MAPA publicou uma normativa, verificada na Portaria SDA nº 171 que aborda a proibição do uso de antimicrobianos promotores de crescimento como tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina, sendo a colistina proibida desde 2016 (BRASIL, 2018).

Um estudo realizado por Salois et al. (2016), nos Estados Unidos, avaliou os impactos econômicos e ambientais da retirada de antimicrobianos utilizados na criação de frangos de corte. A pesquisa revelou que os antimicrobianos são fundamentais para manter a saúde dos animais e que essa ação resultaria em

prejuízos econômicos, além de impactos na conservação de recursos naturais. Segundo Bengtsson e Greko (2014), com a retirada dos antimicrobianos da cadeia de produção avícola, os custos para manter o animal saudável e o preço das matérias-primas para confecção dos alimentos se tornam maiores, refletindo no custo do produto para o consumidor.

Paralelamente, existem alternativas para substituir o uso dos antimicrobianos como um maior controle no setor e sistema de produção, incluindo sanidade e higiene, cuidados com a alimentação dos animais, investindo em produtos de origem natural, enzimas digestivas, probióticos, prebióticos e complexos minerais orgânicos, além de manter os animais vacinados. Porém, a eficácia depende da combinação de diversos fatores que eleva o custo final do produto (ALLEN et al., 2013; DIAZ-SANCHEZ et al., 2015).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

Isolar e caracterizar *Salmonella* spp. a partir de cortes de frangos comercializados na cidade de Francisco Beltrão - PR e verificar o perfil de resistência dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados na terapêutica humana.

### **2.2 Específicos**

- Isolar e caracterizar por meio de análises fenotípicas cepas de *Salmonella* spp. isoladas de amostras de cortes de frangos;
- Identificar por meio de MALDI-TOF os isolados bacterianos provenientes de amostras de cortes de frangos;
- Caracterizar o perfil de resistência dos isolados frente aos antimicrobianos utilizados na prática clínica humana;
- Analisar a ocorrência de cepas com caráter multirresistentes entre os isolados;
- Verificar a presença de cepas produtoras de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Coleta das amostras**

No período de abril a agosto de 2019 amostras de carne de frango (n=40) foram adquiridas de supermercados do município de Francisco Beltrão, PR. As amostras eram compostas de cortes de frangos resfriados (n=23) e cortes de frangos congelados (n=17), sendo os cortes: coxas e sobrecoxas (n=28), coxinha da asa (n=7) e filé de peito (n=5). As amostras foram obtidas em condições usuais de embalagem e comercialização e, em seguida, foram acondicionadas em recipiente com isolamento térmico e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, campus de Francisco Beltrão – PR, onde permaneceram sob refrigeração até o momento das análises microbiológicas. As amostras foram submetidas a pesquisa de *Salmonella* spp. segundo Brasil (2003) e foram realizadas segundo as metodologias preconizadas por Silva et al. (2010).

#### **3.2 Análises Microbiológicas**

##### **3.2.1 Pesquisa e isolamento de *Salmonella* spp.**

Alíquotas de 25 g de cada amostra de cortes de frango a serem analisadas foram pesadas e transferidas, assepticamente, para frascos contendo 225 mL de água peptonada tamponada 0,1% (OXOID) para realização do pré-enriquecimento. Os frascos foram incubados por  $24 \pm 2$  horas em estufa bacteriológica a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . Alíquotas de 1,0 mL e 0,1 mL do enriquecimento não seletivo foram inoculadas, respectivamente, em 10 mL de Caldo Selenito Cistina (SC) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (RV). O caldo SC foi incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas e o caldo RV a  $42^\circ\text{C}$  por 24 horas. Após o crescimento em meio seletivo em caldo SC e em caldo RV foram realizadas estrias por

esgotamento, a fim de obter colônias isoladas nos meios Ágar Hektoen entérico (HE) e Ágar Xilose Lisina Desoxicolato de Sódio (XLD), os quais foram utilizados como meios sólidos seletivos e diferenciais e incubados a 37°C por 24 horas.

Das amostras que apresentaram colônias típicas de *Salmonella* spp. foram selecionadas 10 colônias isoladas, as quais foram transferidas individualmente para tubos de ensaio contendo 2 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) (ACUMEDIA) e incubadas por 24±2 horas em estufa bacteriológica a 37±1°C a fim de aumentar a carga bacteriana. Uma alíquota foi armazenada em temperatura de congelamento em solução estoque de BHI + glicerol (20%) e o restante foi utilizado para realização da coloração diferencial de Gram (SILVA et al., 2010) e provas bioquímicas.

### **3.2.2 Provas bioquímicas**

Colônias típicas de *Salmonella* spp. foram repicadas para placas contendo ágar MacConkey (ACUMEDIA) e incubadas em estufa a 37°C, por 24±2h, com o intuito de observar a capacidade da fermentação da lactose, sendo que, a maioria dos sorotipos de *Salmonella* spp não fermentam esse carboidrato. Posteriormente, foi selecionada uma colônia isolada, semeada em Kit para identificação de enterobactérias (NEWPROV) e incubadas em estufa a 37°C, por 24 ± 2h.

O kit é composto por 5 tubos contendo meios EPM, lisina, MIO, citrato e rhamnose e permite a realização de 10 provas bioquímicas, incluindo desaminação do L-triptofano, produção de H<sub>2</sub>S, fermentação da glicose, produção de gás, descarboxilação da lisina e ornitina, produção de indol, motilidade, utilização do citrato como fonte de carbono e fermentação da rhamnose. O procedimento técnico de inoculação foi realizado de acordo com a bula do Enterokit.

Inicialmente foi recolhida metade de uma colônia com agulha bacteriológica flambada e inoculada no tubo de EPM por picada central até o fundo e estrias na superfície inclinada no meio. Sem flambar a agulha, foi inoculado o tubo de lisina por picada central até o fundo e posteriormente o tubo

MIO foi inoculado com a mesma agulha, sem flambar, por picada central até o fundo, cuidando para que ao voltar, a agulha tenha seguido o mesmo trajeto, para não interferir na leitura da motilidade da bactéria.

Feito isso, a agulha foi flambada e recolheu-se a outra metade da mesma colônia para inoculação no tubo de Rhamnose por picada central até o fundo e depois no tubo de citrato, estriando a superfície inclinada do meio no tubo.

Para a leitura e interpretação dos resultados do Enterokit seguiu-se as recomendações do fabricante. No tubo de EPM a desaminação do L-triptofano é evidenciada pelo desenvolvimento de cor verde-garrafa no ápice do tubo. A leitura da glicose é feita pela observação de coloração amarela na base do tubo, com ou sem produção de gás, evidenciado pela ruptura do meio ou a formação de bolhas. A produção de gás sulfídrico é verificada pelo aparecimento de cor negra. No tubo de lisina, a cor amarela brilhante revela uma reação negativa e qualquer cor diferente de amarelo é considerado positivo. O tubo de MIO permite a leitura das provas de motilidade, descarboxilação da ornitina e produção de indol. A motilidade é observada pela turvação do meio, enquanto se houver crescimento somente na picada, a prova é considerada negativa. A interpretação da ornitina é semelhante à da lisina, ou seja, cor amarela indica prova negativa e qualquer outra cor é considerada positiva. O indol é revelado pelo acréscimo de algumas gotas do reativo de Kovacs, a formação de anel de cor vermelha significa que houve a produção de indol, portanto a prova é positiva. No tubo de citrato o meio de cor verde se torna azul em caso de positividade e permanecendo verde para provas negativas. Por fim, o tubo de rhamnose com cor original verde, torna-se amarelo em caso de prova positiva.

A Newprov fornece aos usuários do Enterokit, um sistema numérico para facilitar a identificação das enterobactérias. As 10 provas bioquímicas, incluindo a da fermentação da lactose realizada no ágar MacConkey, foram agrupadas em 4 conjuntos, sendo que para cada prova foi atribuído um número. No caso de prova positiva, é colocado o número correspondente, enquanto para provas negativas é atribuído o valor 0. A soma de cada elemento desse conjunto fornece um número de quatro dígitos conforme exemplo demonstrado na Tabela 1, que sugere o gênero e a espécie bacteriana (Manual de identificação de

enterobactérias, Newprov).

Tabela 1. Sistema para identificação de enterobactérias- NEWPROV.

TRI	LAC	H <sub>2</sub> S	GLI	GAS	LIS	IND	ORN	MOT	CIT	RHA
6	2	1	6	2	1	6	2	1	2	1
	9			9			9			3

TRI- Triptofano, LAC- lactose, H<sub>2</sub>S- ácido sulfídrico, GLI- glicose, LIS- lisina, IND- indol, ORN- ornitina, MOT- motilidade, CIT- citrato, RHA- rhamnose.

### 3.3 Confirmação do gênero *Salmonella* por MALDI-TOF

Foram selecionadas, de forma aleatória, quatro colônias de cada amostra que apresentou colônias com comportamento bioquímico de *Salmonella* spp, totalizando 28 isolados. As amostras foram semeadas pela técnica de esgotamento em ágar BHI (ACUMEDIA) de forma a obter colônias isoladas e foram imediatamente enviadas via Sedex para o laboratório AQUACEN da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) para confirmação do gênero *Salmonella* a partir da metodologia de MALDI –TOF.

Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado (BENAGLI et al. 2011).

### 3.4 Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA)

Os testes de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método de difusão em ágar, segundo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2005). Foram preparadas suspensões recentes das bactérias isoladas das amostras pesquisadas. Suspendeu-se colônias em solução salina estéril 0,85% até obter-se uma turvação compatível com o grau 0,5 da escala de MacFarland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). Cada suspensão foi inoculada com o auxílio de um *swab* na superfície de placas contendo Ágar Mueller Hinton (MH). Após a secagem da superfície do ágar adicionou-se assepticamente com o auxílio de

uma pinça os discos de papel impregnados com antimicrobianos. As placas com os antimicrobianos foram incubadas em estufa bacteriológica a 36°C por 18 a 24 horas. Após esse período com auxílio de uma régua foram medidos os diâmetros dos halos inibitórios de cada disco.

Foram utilizados os seguintes discos impregnados de antimicrobianos para testar os isolados de *Salmonella*: ampicilina (10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (20/10 µg), cefalotina (30 µg), cefalexina (30 µg), ácido nalidíxico (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), azitromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), sulfazotrim (25 µg), meropenem (10 µg), nitrofurantoína (300 µg), imipenem (10 µg), ceftriaxona (30 µg) cefepime (30 µg). Como controle de qualidade foram utilizadas cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (cedidas pela Unisep - União de Ensino do Sudoeste do Paraná) e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz). A leitura e a interpretação dos resultados foram realizadas de acordo com os padrões do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2005).

### **3.5 Pesquisa fenotípica de ESBL**

As amostras que apresentaram resistência a ceftriaxona (cefalosporina de terceira geração) foram submetidas a pesquisa fenotípica para a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) pelo teste de disco aproximação descrito por Jarlier et al. (1988). O preparo da suspensão e o inóculo em placa de Ágar Mueller-Hinton foi realizado da mesma maneira como no teste de antibiograma recomendado pela CLSI (2005). Posteriormente, no centro da placa foi adicionado um disco contendo amoxicilina/ácido clavulânico, e ao redor deste, foram colocados discos de beta-lactâmicos como ceftriaxona, ceftazidima, cefoxitina e cefepime à uma distância de 20 mm centro a centro e incubados a 37°C por 18 horas. O teste foi considerado positivo quando houve aparecimento de halo fantasma ou ainda distorção do halo ao redor do disco beta-lactâmico (CLSI, 2007).



#### 4. REFERÊNCIAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual da ABPA 2018**. Disponível em: <<http://abpabr.com.br/setores/avicultura/mercadointerno/frango/abate-de-frango>> Acesso: maio, 2019.

ALLEN, H. K. et al. Treatment, promotion, commotion: antibiotic alternatives in foodproducing animals. **Trends Microbiol**, v. 21, n.3, p. 114-119, 2013.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

APAJALAHTI, J. Comparative gut microflora, metabolic challenges, and potential opportunities. **Journal of Applied Poultry Research**, v.14, n.2, p.444-453, 2005.

ARANDA, M. A. et al. Panorama da avicultura: balanço do comércio brasileiro e internacional. **Revista Espacios**, v. 38, n. 21, p.1-8, 2017.

ARIAS, M. V. B.; DE MAIO CARRILHO, C. M. D. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina**, v. 33, n. 2, p.775-790, 2012.

BARROS, M. R. et al. Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isoladas de frango de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. **Pesq. Vet. Bras.** v. 35, n. 5, p. 405-410, 2012.

BENAGLI, C. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. **PLoS One**. v. 6, n.1, e16424, 2011.

BENGTSSON, B.; GREKO, C. Antibiotic resistance-consequences for animal health, welfare, and food production. **Ups J Med Sci**. v. 119, n. 2, p. 96-102, 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Aditivos**

**proibidos na alimentação animal e legislação correspondente.** 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas.pdf>> Acesso: setembro, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 20, de 21 de outubro de 2016.** Diário Oficial da União. Brasília de 25 out. 2016. Seção 1, p.13.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003.** Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da 35 República Federativa do Brasil, Brasília, 18 set. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/ Secretaria de Defesa Agropecuária. **PORTARIA Nº 171, DE 13 DE DEZEMBRO DE 2018.** Diário Oficial da União. Brasília de 19 dez. 2018. Seção 1, p.23.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.:** diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.** 2018 Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>>. Acesso: setembro, 2019.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology.** v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

CAFFER, M. I.; TERRAGNO, R. **Manual de Procedimientos para la Caracterizacion de *Salmonella*.** Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. Departamento de Bacteriologia. Argentina: 2001.

CANGEN, J. R. Food poisoning and diarrhea: Small intestine efectes. **Curr Gastroenteral,** v. 13, n. 5, p. 442-448. 2011.

CARVALHO, C. G. M. et. al. Detection of *Salmonella* spp. through polymerase chain reaction (PCR) on eggs commercialized in Fortaleza, Ceará. **Nutrivisa – Revista de Nutrição e Vigilância em Saúde**. v. 2, n. 3, p. 113-118, 2016.

CHANTZIARAS, I. et al. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 3, p. 827-834. 2014.

CLSI, Clinical and laboratory standards institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 8th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005. 58p.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; informational supplement**. 16th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2007.

DE JONG, H. K., et al. Host–pathogen interaction in invasive salmonellosis. **Plos Pathogens**, v. 8, n. 10, e1002933. 2012.

DE SALES SOUZA, I. J. G. et al. Condições não patológicas de carcaças de frangos em um matadouro-frigorífico sob inspeção federal no estado do Piauí. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v. 10, n. 1, p. 68-77, 2016.

DIARRA, M. S.; MALOUM, F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. **Frontiers in Microbiology**, v.5, n. 5, p.1-15, 2014.

DIAZ-SANCHEZ, S. et al. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. **Poult Sci**. v. 94, n. 6, p. 1419-1430, 2015.

EFSA - European Food Safety Authority. **Explains zoonotic diseases: Salmonella**. 2014. Disponível em: <[http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/factsheetsalmonella.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf)>. Acesso: maio, 2019.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Produção de Aves**, 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-deaves/producao-de-aves/producao>> Acesso: maio, 2019.

ESPÍNDOLA, C. J. Trajetórias do progresso técnico na cadeia produtiva de carne de frango do Brasil. **Revista Geosul**, v. 27, n. 53, p. 89-113, 2012.

FARDSANEI, F. et al. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. **Microbial Pathogenesis**, v.107, p.451-456, 2017.

FDA. Food and Drug Administration. **CVM reports on antimicrobials sold or distributed for food producing animals.** 2015 <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm440585.htm>> Acesso: junho, 2019.

FRANCO, B. D. G. M, LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos.** São Paulo: Atheneu, 2005. 183 p.

GABRIEL, I. et al. Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry. *World's Poultry Science Journal*, v. 62, n. 3, p. 499–511, 2006.

GARCIA-MIGURA, L. et al. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Vet Microbiol.** v.170, n. 1, p.1-9, 2014.

GIBSON, D. L. et al. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 22, p. 7722-7730, 2006.

GUIBOURDENCHE, M. et al. X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-KauffmannLe Minor scheme. **Res. Microbiol.**, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim Nova**, v. 33, n.3, p. 667-679, 2010.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2003.

JARLIER, V. et al. Extended broadspectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis.** v. 10, n. 4, p. 867-878, 1988.

JEURISSEN, S. H. M. et al. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Horizon Scientific Press**, v. 3, p.1-14, 2002.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico. Texto e Atlas Colorido**. Sexta Ed. Guanabara Koogan. 2008.

KOTTWITZ, L. B. M. et al. Avaliação Epidemiológica de Surtos de Salmonelose Ocorridos no Período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**. v. 32. n. 1. p.9-15, 2010.

LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs - which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**. v. 134, n. 1, p. 21-28, 2009.

MODI, C. M. et al. Growth promoting use of antimicrobial agents in animals. **J Applie Pharma Sci**. v. 1, n. 8, p. 33-36, 2011.

MONTEZANI, E.; et al. Isolamento de *Salmonella* spp. e Staphylococcus aureus em carne de frango e condições dos estabelecimentos comerciais no município de Tupã-SP. **Colloquium Vitae**. v. 9, n. 2, p. 30-36, 2018.

OCEPAR. Sistema OCEPAR. **Organização das Cooperativas Paranaenses**. OCEPAR: Há 47 anos promovendo o cooperativismo paranaense. 2018. Disponível em: <<http://www.paranacooperativo.coop.br/ppc/index.php/sistema-ocepar/comunicacao/2011-12-07-11-06-29/ultimas-noticias/117110-ocepar-ha-47-anos-promovendo-o-cooperativismo-paranaense>> Acesso: outubro, 2019.

OLEFORUH-OKOLEH, V. U. et al. Evaluation of growth performance, haematological and serum biochemical response of broiler chickens to aqueous extract of ginger and garlic. **Journal of Agricultural Science**, v.7, n.4, p.167-173, 2015.

OLIVEIRA, A. P. et al. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.9, n.16, p.1947-1972, 2013.

PANDINI, J. A. et al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana dos sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. **Arq. Inst.**

**Biol.** v. 82, p.1-6, 2014.

PELICANO, E. R. L. et al. Performance of broilers fed diets containing natural growth promoters. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.6, n.4, p.231-236, 2004.

RECK, A. B.; SCHULTZ, G. Aplicação da metodologia multicritério de apoio à decisão no relacionamento interorganizacional na cadeia da avicultura de corte. **Rev. Econ. Sociol. Rural**. v. 54, n. 4, p. 709- 728, 2016.

REYES, A. W. B., et al. The in vitro and in vivo protective effects of tannin derivatives against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Microbial Pathogenesis**, v.109, p.86-93, 2017.

RIBEIRO, A. R. et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella Enteridis* isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1259-1262, 2008.

ROLAIN, J. M. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. **Front Microbiol**. v. 4, n. 173. p. 1-10, 2013.

SALOIS, M. J.; CADY, R. A.; HESKETT, E. A. The environmental and economic impact of withdrawing antibiotics from US broiler production. **J Food Distrib Res**, v. 47, n. 1, p. 79-80, 2016.

SANTANA, E. S. et al. Uso de produtos alternativos aos antimicrobianos na avicultura. **Enciclopédia Biosfera**, v.7, n.13, p.985-1009, 2011.

SHINOHARA, N. K. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p.1675-1683, 2008.

SILVA, K. R. C.; MENÃO, M. C. Avaliação microbiológica de cortes de frangos comercializados na cidade de São Paulo. **Atlas de Saúde Ambiental**, v. 3, n. 2, p. 17-23, 2016.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Varela. 2010. 624p.

- STANTON, T. B. A call for antibiotic alternatives research. **Trends Microbiol.** v.21 n. 3, p. 111-113, 2013.
- TEIXEIRA, L. C.; LIMA, A. M. C. Ocorrência de *Salmonella* e *Listeria* em carcaças de frango oriundas de dois sistemas de criação no município de Campinas, SP. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.3, p.191-196, 2008.
- TEPLITSKI, M.; AL-AGELY, A.; AHMER, B. M. M. Contribution of the SirA regulon to biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Microbiol Sgm** v. 152, n. 11, p. 3411–3423, 2006.
- TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Curr Opin Microbiol**, v.4, n. 5, p. 493-499, 2001.
- TINDALL, B. J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **Int J Syst Evol Micr.** v.55, n.1, p.521-524, 2005.
- TORTORA, G. J, FUNKE, B. R, Case CL. **Microbiologia**. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2012. 706-721p.
- VAN BOECKEL, T. P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proc. Natl Acad. Sci.** v. 112, n.18, p. 5649-5654. 2015.
- VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, v. 33, n.4, p. 406-414, 2009.
- VOGADO, G. M. S. Evolução Da Avicultura Brasileira, **Nucleus Animalium**, v.8, n.1, p. 49-58, 2016.
- VOILA, M.; TRICHES, D. A cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2012. **Revista Teoria e Evidência Econômica**, v. 21, n. 44, p. 126-148. 2015.
- VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poult. Sci.** v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015.
- WEI, R. et al. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu, China. **Chemosphere**. v. 82, n. 10, p. 408-414, 2011.
- WELKER, C. A. D. et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em

surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Bras de Bioc.** v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso: maio, 2019.

ZAGONEL, E. F. et al. Avaliação presuntiva da qualidade higiênico-sanitária de coxas e sobrecoxas de frango resfriadas obtidas comercialmente. **Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc Videira**, v. 2, p. 13457, 2017.

ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of Veterinary antibiotics in masures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Sci Total Environ.** v. 408, n. 5, p. 1069- 1075, 2010.



## 5. ARTIGO CIENTÍFICO 01

### ISOLATION, CHARACTERIZATION, AND RESISTANCE PROFILE OF *Salmonella* spp. ISOLATED FROM CHICKEN CUTS

#### Isolation and resistance profile of *Salmonella* spp.

Ana Carolina Pereira da Silva\*, Thalia de Paula Morais\*, Kérley Braga Pereira Bento  
Casaril\*

\*Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus Francisco Beltrão – PR, Centro de  
Ciências da Saúde- Rodovia Vitório Traiano, Km2, Bairro Água Branca, Francisco  
Beltrão- Paraná, Brasil. CEP: 85.601-970.

**ABSTRACT: Introduction:** Chicken meat is widely consumed in Brazil and can be a vehicle for pathogenic microorganisms such as *Salmonella* spp. Antimicrobial agents have been used in poultry for several years to control the proliferation of these microorganisms, and such prolonged exposure has favored the emergence of resistance mechanisms in strains of *Salmonella* spp. **Method:** Forty samples of chicken cuts were purchased from supermarkets in Francisco Beltrão – PR for the detection of *Salmonella* spp. The suspected colonies underwent biochemical testing for the identification of enterobacteria. Four colonies were selected from each sample positive for the bacteria, totaling 28 isolates, which were submitted to the antimicrobial sensitivity test. Samples that showed resistance to ceftriaxone were subjected to extended-spectrum beta-lactamases (ESBL). **Results:** Among the analyzed bacterial samples, seven showed biochemical behavior characteristic of *Salmonella* spp. (17.5%). All isolates submitted to

antimicrobial susceptibility testing had the *Salmonella* genus confirmed by MALDI-TOF and demonstrated sensitivity to meropenem, and 100% of the isolates were resistant to nalidixic acid. High resistance to beta-lactam antimicrobials was observed. Seventeen different resistance profiles were found, of which 42.85% had a multi-resistance profile, and 21.42% of the isolates had a phenotype for ESBL production. **Conclusion:** The frequency of lots contaminated by *Salmonella* spp. highlight the importance of proper handling of these foods to prevent salmonellosis outbreaks, since high levels of resistance were found, placing the treatment of *Salmonella* spp. infections at risk.

**Keywords:** Antimicrobials, microbiota, microorganisms, poultry

## INTRODUCTION

Chicken meat is widely consumed by Brazilians since it is considered a healthy, nutritious food, with high protein content. However, this food constitutes a vehicle for pathogenic microorganisms and can cause infections in the consumer population<sup>1</sup>.

The gastrointestinal tract health maintenance of chickens and adequate conditions of hygiene during production and rearing are essential to guarantee the quality of the food that reaches the consumer's table. However, the integrated production system and the innumerable processes that the food undergoes until it reaches the consumer contribute to the birds' poor health, thus increasing the risk of contamination<sup>1,2</sup>.

Among the microorganisms that inhabit chickens and can cause diseases in humans, the one of greatest clinical importance is the bacterium *Salmonella* spp. Despite all technological development and the adoption of hygiene measures by breeders and poultry industries, infections by *Salmonella* spp. are the most common foodborne

diseases worldwide, with most serotypes of the genus being pathogenic to humans. Research has revealed the presence of this bacterium in at least one-third of the broiler samples analyzed<sup>2,3,4,5</sup>.

For years, antimicrobial agents have been used on a large scale in the production of chickens for therapeutic, prophylactic purposes and as growth promoters. The long-term use of antimicrobial agents in farm animals exerts selective pressure on bacteria, contributing to the development of resistance. Since these animals are intended for human consumption, it is possible that these microorganisms, as well as their resistance genes, may be incorporated into the human microbiota through direct contact with the bird or the ingestion of food or water contaminated with the bacteria<sup>6,7</sup>.

In this context, the present study aimed at isolating and characterizing *Salmonella* spp. from chicken cuts marketed in Francisco Beltrão – PR, and verify the resistance profile of the isolates against antimicrobials used in human therapy.

## **METHOD**

From April to August 2019, samples of chicken meat (n = 40) were purchased in supermarkets in Francisco Beltrão – PR. The samples consisted of chilled chicken cuts (n=23) and frozen chicken cuts (n=17), including thighs and drumsticks and wing, leg, and breast fillet. The samples were obtained under conventional packaging and commercial conditions.

The investigation of *Salmonella* spp. was carried out according to Brasil (2003)<sup>8</sup> and followed the methodologies recommended by Silva *et al.* (2010)<sup>9</sup>. Suspicious colonies were screened by biochemical testing using a kit for the identification of

enterobacteria (NEWPROV)<sup>10</sup>, which includes biochemical tests such as deamination of L-tryptophan, production of H<sub>2</sub>S, glucose fermentation, gas production, decarboxylation of lysine and ornithine, indole production, motility, use of citrate as a carbon source, and rhamnose fermentation.

Four colonies were selected from each sample that exhibited colonies with biochemical behavior of *Salmonella* spp., totaling 28 isolates. The samples were sent to the AQUACEN laboratory of the Veterinary School of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) for confirmation of the *Salmonella* genus using the MALDI –TOF methodology.

The sensitivity test to antimicrobials was conducted using the agar diffusion method, according to recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2005<sup>10</sup>. The tested antimicrobial agents included ampicillin (10 µg), amoxicillin + clavulanic acid (20/10 µg), cephalothin (30 µg), cephalexin (30 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), azithromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), sulphazotrin (25 µg), meropenem (10 µg), nitrofurantoin (300 µg), imipenem (10 µg), ceftriaxone (30 µg), and cefepime (30 µg). Reference strains of the American Type Culture Collection were used, namely: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (provided by the Microbiology Laboratory of the Regional Hospital of Southwest Paraná), and *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (supplied by the Oswaldo Cruz Institute).

The results were read and interpreted according to CLSI (2005)<sup>10</sup> standards. Isolates with resistance to third-generation cephalosporins (ceftriaxone) were subjected to phenotypic evaluation for the production of ESBL, performed using the disc approximation technique, according to CLSI standards (2007)<sup>11</sup>.

## RESULTS

Among the total samples analyzed (n = 40), seven lots exhibited colonies with biochemical behavior suggestive of the genus *Salmonella* spp. (17.5%), five of which were from chilled samples and two, from frozen samples, including cuts of thigh and drumstick and wing drumette, as described in Table 1. All isolates referred for identification by MALDI-TOF were confirmed for the *Salmonella* genus.

Table 1. Number of samples analyzed and positive for *Salmonella* spp. isolated from chicken cuts marketed in Francisco Beltrão – PR, according to cut and marketing conditions.

Cuts	Marketing condition	Total samples analyzed	Total positive samples
Wing drumstick	Chilled	N=7	N=1
Thigh and drumstick	Frozen	N=13	N=2
Thigh and drumstick	Chilled	N=15	N=4
Breast fillet	Frozen	N=3	N=0
Breast fillet	Chilled	N=2	N=0

N= Number of samples

The antimicrobial susceptibility test results (Table 2 and Picture 1) revealed that the strains of *Salmonella* spp. showed resistance to nalidixic acid (100%), sulphazotrin (3.57%), amoxicillin with clavulanate (17.85%), cephalothin (39.28%), gentamicin (28.57%), azithromycin (28.57%), ampicillin (32.14%), imipenem (3.57%), cephalexin (39.28%), nitrofurantoin (50%), ceftriaxone (35.71%), and cefepime (21.42%).

All isolates analyzed showed sensitivity to meropenem, whereas 100% were resistant to nalidixic acid, representative of the class of first-generation quinolones. When subjected to ciprofloxacin, a third-generation quinolone, no resistance was observed. The strains showed only intermediate resistance and sensitivity (Picture 1).

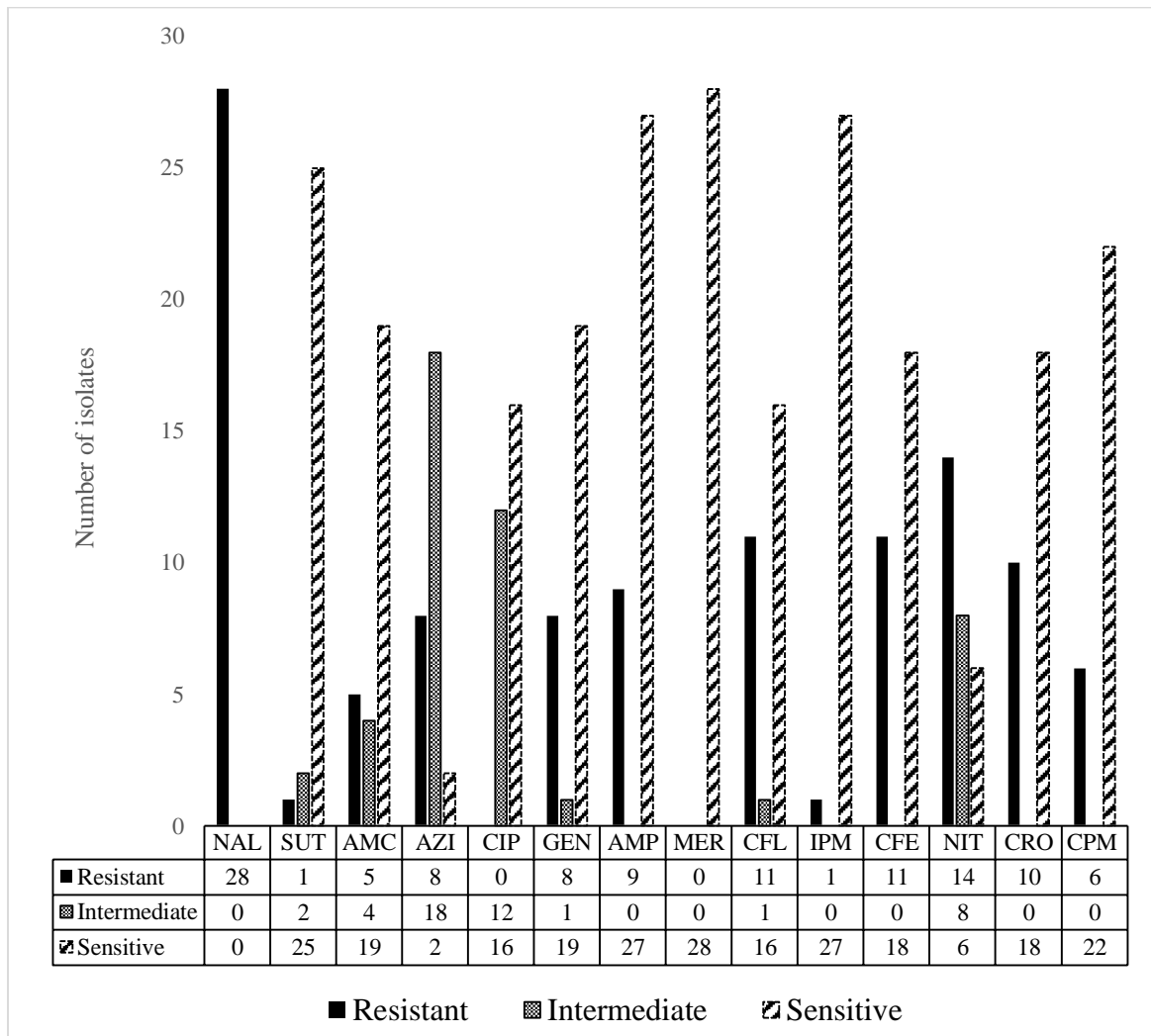
Table 2. Antimicrobial sensitivity profile of the isolates selected for the *Salmonella* spp. antibiogram test from broiler cuts marketed in Francisco Beltrão – PR in 2019.

Sample-Colony	Antimicrobials													
	NAL	SUT	AMC	AZI	CIP	GEN	AMP	MER	CFL	IPM	CFE	NIT	CRO	CPM
1-1	R	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S
1-5	R	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S
1-8	R	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S
1-10	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
2-2	R	S	R	I	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S
2-4	R	S	R	I	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S
2-7	R	S	R	I	I	R	R	S	R	S	R	S	R	S
2-9	R	S	R	I	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S
3-3	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
3-7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
3-9	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
3-10	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
4-1	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S
4-2	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
4-3	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
4-5	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
5-1	R	S	S	I	I	S	S	S	R	S	S	R	S	S
5-2	R	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S
5-5	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
5-6	R	R	S	R	I	S	S	S	I	S	R	R	S	S
6-1	R	S	I	R	S	R	R	S	R	S	R	I	R	R
6-4	R	S	R	R	I	R	R	S	R	S	R	R	R	R
6-5	R	I	I	I	I	R	R	S	R	R	R	R	R	R
6-8	R	S	I	I	I	I	R	S	R	S	R	R	R	R
7-1	R	S	S	I	I	R	S	S	S	S	S	R	S	S
7-5	R	S	S	I	S	R	S	S	R	S	R	I	R	R
7-7	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7-10	R	S	S	I	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R

NAL- Nalidixic Acid, SUT- Sulfazotrim, AMC- Amoxicillin + Clavulanic Acid, AZI- azithromycin, CIP- Ciprofloxacin, GEN- Gentamicin, AMP- Ampicilin, MER- Meropenem, CFL- Cephalotin, IPM – Imipenem, CFE- Cephalexin, NIT- Nitrofurantoin, CRO- Ceftriaxone, CPM- Cefepime.

R- Resistant, S- Sensitive, I- Intermediate

Fig. 1: Number of isolates with intermediate resistance, resistance and sensitivity to antimicrobials tested.



NAL- Nalidixic Acid, SUT- Sulfazotrim, AMC- Amoxicillin + Clavulanic Acid, AZI- azithromycin, CIP- Ciprofloxacin, GEN- Gentamicin, AMP- Ampicilin, MER-



Meropenem, CFL- Cephalotin, IPM – Imipenem, CFE- Cephalexin, NIT- Nitrofurantoin, CRO- Ceftriaxone, CPM- Cefepime.

Considering the total isolated, 42.8% were resistant to at least one of the beta-lactam agents tested, in which the first-generation cephalosporins, cephalexin and cephalothin, and ampicillin showed the highest percentage of resistance within this class of antimicrobials (resistance percentages of 39.28%, 39.28%, and 32.14%, respectively).

Ten isolates (35.7%) were resistant to third-generation cephalosporins (ceftriaxone) and underwent phenotypic analysis regarding ESBL production. Among the ten isolates tested, six revealed this resistance mechanism phenotype, evidenced by halo distortion and the formation of a “phantom zone” in the approach disc test.

In addition to resistance against third-generation cephalosporins, 21.4% of the tested microorganisms were resistant to cefepime, a fourth-generation cephalosporin, and one isolate (6-5) showed resistance to imipenem, a representative of the carbapenem class.

In this study, 17 different resistance profiles (P1 to P17) were identified, as shown in Table 3. The most frequent profiles were P3, represented by five of the 28 isolates (17.8%), characterized by resistance to nalidixic acid, intermediate resistance to azithromycin and nitrofurantoin, and sensitivity to the other tested antimicrobials, and P6, with four isolates (14.2%) exhibiting resistance to nalidixic acid, azithromycin, and nitrofurantoin, intermediate resistance to ciprofloxacin, and sensitivity to the other tested antimicrobials.

Of the total of isolated, 42.8% presented a multidrug resistance profile, showing resistance to three or more different classes of antimicrobials, 21.4% of which exhibited an ESBL production phenotype, evidenced by the approach disc test (Table 3).

Table 3: Resistance profiles and intermediate resistance of 28 isolates of *Salmonella* spp. from chicken cuts marketed in Francisco Beltrão – PR

Resistance profiles	Antimicrobial resistance	Classes <sup>1</sup>	ESBL <sup>2</sup>	Isolates <sup>3</sup> (%)
P1	NAL (NIT)	2	-	1 (3,5)
P2	NAL, GEN	2	-	1 (3,5)
P3	NAL (AZI), (NIT)	3	-	5 (17,8)
P4	NAL (AZI), (CFL)	3	-	1 (3,5)
P5	NAL, NIT (AZI)	3	-	3 (10,7)
P6	NAL, AZI, NIT (CIP)	3	-	4 (14,2)
P7	NAL, GEN, CRO, CPM (AZI), (NIT)	5	+	1 (3,5)
P8	NAL, AMC, AMP, CFL, CFE, CRO (AZI)	3	-	3 (10,7)
P9	NAL, CFL, NIT (AZI), (CIP)	4	-	1 (3,5)
P10	NAL, GEN, NIT (AZI), (CIP)	4	-	1 (3,5)
P11	NAL, AMC, GEN, AMP, CFL, CFE, CRO (AZI), (CIP)	4	-	1 (3,5)
P12	NAL, AMP, CFL, CFE, NIT, CRO, CPM (AMC), (AZI), (CIP), (GEN)	5	+	1 (3,5)
P13	NAL, AZI, GEN, AMP, CFL, CFE, CRO, CPM (AMC), (NIT).	5	+	1 (3,5)
P14	NAL, GEN, AMP, CFL, CFE, NIT, CRO, CPM (AMC), (AZI)	5	+	1 (3,5)
P15	NAL, SUT, AZI, CFE, NIT (CIP), (CFL)	5	-	1 (3,5)
P16	NAL, AMC, AZI, GEN, AMP, CFL, CFE, NIT, CRO, CPM (CIP)	5	+	1 (3,5)
P17	NAL, GEN, AMP, IPM, CFL, CFE, NIT, CRO, CPM (SUT), (AMC), (AZI), (CIP)	6	+	1 (3,5)

\* Profiles in parentheses: strains with intermediate resistance to antimicrobials

1 Number of classes of antimicrobials to which the isolates were resistant

2 ESBL phenotypic research using the disk approximation method

3 Number of isolates that presented a determined resistance profile

+ Positive result, - Negative result

NAL- Nalidixic Acid, SUT- Sulfazotrim, AMC- Amoxicillin + Clavulanic Acid, AZI- azithromycin, CIP- Ciprofloxacin, GEN- Gentamicin, AMP- Ampicilin, MER- Meropenem, CFL- Cephalotin, IPM – Imipenem, CFE- Cephalexin, NIT- Nitrofurantoin, CRO- Ceftriaxone, CPM- Cefepime.

## DISCUSSION

The frequency of 17.5% positivity for *Salmonella* spp. in the lots analyzed in the present survey was similar to other studies found in the literature. Cardoso *et al.* (2015)<sup>12</sup> verified a 14.6% presence of *Salmonella* spp. in chicken samples in São Paulo state between 2000 and 2010. However, the frequency of batches destined for commercialization contaminated by *Salmonella* spp. is quite variable. In a study by Zagonel *et al.* (2017)<sup>2</sup>, the presence of this bacterium was found in 100% of chilled chicken meat samples sold in the Alto do Vale do Peixe region in Santa Catarina. Meanwhile, Trainotti *et al.* (2013)<sup>13</sup>, when analyzing 50 samples of chicken meat, found no serotype of *Salmonella* spp., with all samples meeting the standard of absence of bacteria in 25 g of the analyzed product.

It is known that the application of good manufacturing practices and the Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) assist in controlling the presence of these microorganisms in the production line. According to Yamatogi *et al.* (2016)<sup>14</sup>, the moment of slaughter constitutes the main critical point of contamination of chicken meat. However, some stages that precede slaughter, such as capture and transport, are also crucial considering the contamination and proliferation of pathogenic microorganisms, since they generate a stressful environment for the birds, resulting in the disturbance of intestinal functions and increasing the spread of bacteria in the feces, leading to contamination of the carcass and spread of the pathogen in the production line<sup>14</sup>.

Regarding the sensitivity profile, no isolate was sensitive to all the tested antimicrobials, with nalidixic acid being the drug with the highest percentage of resistance (100% of the isolates), followed by nitrofurantoin, with a percentage of 50% (14 isolates). The high resistance index found herein was similar to other studies that also reported a rate of 100% resistance to at least one of the antimicrobials tested in strains of *Salmonella*

spp.<sup>15</sup>.

Resistance to beta-lactams was found in 42.85% of the isolates, with resistance to at least one representative of this class. Among the beta-lactams, cephalosporins showed a higher percentage of resistance, including third- and fourth-generation representatives.

For many years, conventional treatment for *Salmonella* spp. was performed using a combination of sulfamethoxazole with trimethoprim and a representative of the penicillin group, such as amoxicillin or ampicillin. However, the high resistance that *Salmonella* strains have shown to penicillins rendered third- and fourth-generation cephalosporins more suitable for the treatment of these infections<sup>16</sup>. Therefore, the data found in this study cause concern, since the isolates were also resistant to these drugs.

In the present study, multiresistant isolates were found, that is, resistant to three or more different classes of antimicrobials. Multidrug resistance is a worldwide public health problem. In studies carried out in Spain<sup>17</sup> and Iran<sup>18</sup>, a 100% frequency of multidrug-resistant *Salmonella* spp. strains was found present in chicken cuts. In Turkey<sup>19</sup>, 92.85% of the *Salmonella* spp. exhibited multiresistance profiles. In Brazil, these data are also high. A study conducted by ANVISA<sup>20</sup>, which monitors the prevalence and the sensitivity profile to antimicrobials against *Salmonella* spp. and *Enterococcus* spp. isolated from frozen chicken carcasses, revealed that 76.8% of the 250 samples of *Salmonella* spp. analyzed were classified as multiresistant. Later, Lopes *et al.* (2016)<sup>21</sup> reported that 60% of *Salmonella* Typhimurium isolates showed multidrug resistance.

Resistance to several different classes of antimicrobials is a global alert issue, limiting treatment options for these infections, as well as presenting a high potential for dissemination since bacteria have the ability to transfer resistance genes to other pathogenic microorganisms<sup>22,23</sup>.

When analyzing the different resistance and multiresistance profiles found in this study, it was observed that resistance to beta-lactams was associated with resistance to drugs in the group of quinolones (NAL) and/or nitrofurans (NIT), aminoglycosides (GEN), and macrolides (AZI). These multidrug-resistance phenotypes in *Salmonella* spp. have been associated with the presence of plasmids that carry resistance genes to several antimicrobials, such as strains that produce ESBL enzymes, responsible for conferring resistance to beta-lactams, which generally exhibit co-resistance to quinolones and aminoglycosides<sup>24,25</sup>. Upon performing phenotypic analysis to detect ESBL, six isolates, corresponding to 21.42% of the total samples, presented the phenotype of this resistance mechanism.

Only a few drugs belonging to the carbapenem class retain their activity against ESBL-producing enterobacteria<sup>26</sup>. The occurrence of a resistance profile that includes imipenem (P17), found in this study, is probably due to carbapenem usage in Brazil as a therapeutic alternative to fight these infections. These data highlight the need for the rational use of carbapenems in order to prevent the emergence of new multiresistant microorganisms.

A study carried out in Brazil, between 2007 and 2011, with 12,582 strains of *Salmonella* spp., indicates the exponential growth of isolates with multidrug-resistant profiles, including third-generation cephalosporins<sup>27</sup>. The increasingly high frequency of these multidrug-resistant strains of *Salmonella* spp. may be related to inappropriate antimicrobial usage in the poultry sector and the spread of antimicrobial resistance genes from one bacterium to another. In order to avoid the spread of resistance, caution and responsibility in antimicrobial use in veterinary and human medicine are necessary, in addition to continuous epidemiological monitoring<sup>7</sup>.

Knowing the profile of sensitivity and resistance to antimicrobials of *Salmonella* spp. isolated from food intended for human consumption is extremely imperative since it is an important epidemiological marker and provides data that guide therapy in veterinary and human medicine, both of which use these same antimicrobial agents to treat infections<sup>20</sup>.

## **FINAL CONSIDERATIONS**

Despite the hygienic-sanitary practices adopted during poultry rearing, slaughter, and the processing of chicken meat by agro-industries, *Salmonella* spp. was isolated in 17.5% of the evaluated samples destined for sale in Francisco Beltrão – PR, Brazil. This data highlights the importance of proper cooking and handling of these foods to prevent salmonellosis outbreaks.

The high number of multidrug-resistant phenotypes, including co-resistance among beta-lactams, fluoroquinolones, and aminoglycosides, and antimicrobials of recent generations, is a matter of public health concern, especially due to the ability to transfer resistance from one bacterium to another, generating high-potential dissemination, which places the human treatment of salmonellosis at risk.

It is worth mentioning that optimization by the poultry industries in the production chain and guidance to food handlers regarding hygienic-sanitary aspects, combined with the application of antimicrobial control as growth promoters and prophylactic agents are vital points to avoid the selection and dissemination of resistance to antimicrobials.

## REFERENCES

1. Welker CAD, Both JMC, Longaray SM , Haas S , Soeiro MLT e Ramos RC. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Bras de Bioc. 2010;8(1):44-8.
2. Zagonel EF, Espinola ME, Paris VPS, Gelinski JMLN. Avaliação presuntiva da qualidade higiênico-sanitária de coxas e sobrecoxas de frango resfriadas obtidas comercialmente. Anuário Pesquisa e Extensão Unoesc Videira. 2017;2:13457.
3. Yamaguchi MU, Moarais JF, Frausto HSG, Silverio KI. Qualidade microbiológica de alimentos e de ambientes de trabalho: Pesquisa de *Salmonella* e *Listeria*. Revista em Agronegócio e Meio Ambiente. 2013;6(3):417-34.
4. Silva KRC, Menão MC. Avaliação microbiológica de cortes de frangos comercializados na cidade de São Paulo. Atlas de Saúde Ambiental. 2016;3(2): 17-23.
5. Montezani E, Giuffrida R, Andrade RAP, Silva BL. Isolamento de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em carne de frango e condições dos estabelecimentos comerciais no município de Tupã-SP. Colloquium Vitae. 2018; 9(2):30-6.
6. Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. Correlation between veterinary

- antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(3):827-34.
7. Lai J, Wu C, Wu C, Qi J, Wang Y, Wang H, et al. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in foodproducing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. *International Journal of Food Microbiology.* 2014;180(16):30-8.
  8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial da 35 República Federativa do Brasil, Brasília, 18 set. 2003.
  9. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, dos Santos RFS, Gomes RFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água. 4. ed. São Paulo: Varela. 2010. 624p.
  10. Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the identification of clinically relevant bacteria. *PLoS One.* 2011;6(1):16424.
  11. CLSI, Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 8th ed. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005. 58p.



12. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. CLSI document M100-S17. Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007. Disponível em:< <http://enews.nccls.org/clsi/issues/2006-12-01/2.html>>. Acesso em: janeiro, 2020.
13. Cardoso ALSP, Kanashiro AM, Stoppa GFZ, Castro AGM, Luciano RL, Tessari ENC. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. Revista Científica de Medicina Veterinária. 2015;24:1-12.
14. Trainotti AC, Moraes FF, Begotti IL, Merlini LS. Ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de frangos industrialmente processados procedentes de explorações industriais da região noroeste do estado do Paraná – Brasil. ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer. 2013;9(17):1964-70.
15. Yamatogi RS, Oliveira HC, Possebon FS, Pantoja JCF, Joaquim JGF, Pinto JPAN, et al. Qualitative and quantitative determination and resistance patterns of *Salmonella* from poultry carcass. J. Food Protect. 2016;79(6):950-5.
16. Pandini JA, Pinto FGS, Muller JM, Weber LD, Moura AC. Occurrence and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* spp. serotypes isolated from poultry farms in Paraná, Brazil. Arq. Inst. Biol. 2015;20(10):1-6.

17. Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG. Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis.* 2011;154(1):26-9.
18. Alvarez-Fernández E, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Capita R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *Int J Food Microbiol.* 2012;153(3):281-7.
19. Fallah SH, Asgharpour F, Naderian Z, Moulana Z. Isolation and determination of antibiotic resistance patterns in non-typhoid *Salmonella* spp isolated from chicken. *Int J Enteric Pathog.* 2013;1(1):17-21.
20. Siriken B, Turk H, Yildirim T, Durupinar B, Erol I. Prevalence and Characterization of *Salmonella* Isolated from Chicken Meat in Turkey. *Food Res Int.* 2015;80(5):9-16.
21. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Relatório do Monitoramento da Prevalência e do Perfil de Suscetibilidade aos Antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas Isolados de Carcaças de Frango Congeladas Comercializadas no Brasil. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Brasília, 2012.

22. Lopes GV, Michael GB, Cardoso M, Schwarz S. Antimicrobial resistance and class 1 Integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. *Vet Microbiol.* 2016;194:84-92.
23. Iglesias MA, Kroning IS, Decol LT, Franco MBDG, Da Silva WP. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. *Food Research International*, 2017;100(1):96-101.
24. Fardsanei F, Dallala MMS, Douraghia M, Memarianic H, Bakhshid B, Salehie TZ, et al. Antimicrobial resistance, virulence genes and genetic relatedness of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates recovered from human gastroenteritis in Tehran, Iran. *Journal of Global Antimicrobial Resistance.* 2018;12:220-6.
25. Fernandes SA, Paterson DL, Ghilardi-Rodrigues AC, Adams-Haduch JM, Tavechio AT, Doi Y. CTX-M-2 producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microb. Drug Resist.* 2009; 15(4):317-21.
26. Uma B, Prabhakar K, Rajendran S, Lakshmi Sarayu Y. Prevalence of extended spectrum beta lactamases in *Salmonella* species isolated from patients with acute

gastroenteritis. *Indian J. Gastroenterol.* 2010;29(5):201-4.

27. Pitout JD. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs.* 2010;70(3):313-33.

28. Costa RG, Festivo ML, Araujo MS, Reis EM, Lázaro NS, Rodrigues D.P. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. *J. Food Protect.* 2013;76(12):2011-17.

## 6. ANEXOS



ISSN 0037-8682 *versão impressa*

ISSN 1678-9849 *versão on-line*

### INSTRUÇÕES AOS AUTORES

#### Escopo e política

A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine** é um periódico multidisciplinar, com acesso 100 % aberto, com revisão pelos pares, que publica pesquisas originais em todas as áreas da Medicina Tropical (incluindo epidemiologia, estudo clínicos, patologia e imunologia) e doenças infecciosas. É o periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. A revista publica Artigos Originais, Comunicações Breves, Relatos de Caso, Editoriais, Cartas ao Editor, Imagens em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Relatórios Técnicos, Obituários e Números Especiais (suplementos). Os artigos de revisão são a convite do Editor ou Editores Associados. A Revista publica manuscritos somente em inglês. O seu conteúdo tem acesso livre para os leitores e nenhuma taxa é cobrada dos autores. A partir de 2017, a **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine** estabeleceu que os autores serão requisitados a enviar o certificado de edição profissional da língua inglesa durante o processo de submissão do manuscrito.

◆A partir de janeiro de 2019, a **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine** adotou a modalidade de publicação anual contínua, que está disponível online na biblioteca SciELO.

#### Política de avaliação

Submissão à **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**/*Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* implica que o manuscrito não foi publicado anteriormente (exceto resumo) e que não está sendo considerado para publicação em outro periódico.

Os manuscritos submetidos com vistas à publicação neste periódico são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria para assegurar a adequação às normas. Os manuscritos que preencherem os requisitos serão, em seguida, enviados para avaliação pelo sistema de revisão pelos pares. Os editores utilizarão os relatórios detalhados dos revisores para decidir acerca da aceitação do manuscrito submetido. Em caso de divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado a outro revisor para validar a decisão editorial final de acordo com o fluxograma de submissão da Revista, (disponível online

no endereço <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#006>).

Os manuscritos devem ser escritos em Inglês e submetidos apenas eletronicamente usando o

endereço: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

Baixa qualidade da língua inglesa é a maior causa de atraso na publicação. Recomendamos fortemente aos autores com inglês como língua estrangeira, que seus manuscritos sejam preferencialmente traduzidos e editados por um serviço profissional de tradução e edição do inglês, ou verificados por um pesquisador com inglês como primeira língua. Uma cópia do certificado deve ser enviada para a Revista. O contato com a Secretaria da Revista pode ser estabelecido no endereço abaixo:

**Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**

Av. Getúlio Guaritá s/n, Caixa Postal: 118, CEP: 38001-970

Uberaba, Minas Gerais, Brasil

Fone: 55 34 3318-5255 / 55 34 3318-5279

e-mail: [rsbmt@rsbmt.uftm.edu.br](mailto:rsbmt@rsbmt.uftm.edu.br);

Site: <http://www.scielo.br/rsbmt>

**Submissão *Fast-Track*:** De acordo com a política editorial estabelecida, manuscritos considerados elegíveis para avaliação *Fast-Track* pelos editores da revista serão avaliados por revisores dentro de uma semana e, se aceitos, publicados em quatro a oito semanas. As doenças prioritárias serão escolhidas pelo conselho editorial de acordo com sua ocorrência epidêmica no Brasil e no mundo.

**Preprints:** A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/*Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine* apoia a iniciativa internacional que resulta em um processo editorial mais transparente, atualmente conhecido como tendência Ciência Aberta (*Open Access*). Assim, manuscritos depositados em servidor *preprint* (bioRxiv) poderão ser submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical/*Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*. O processo de revisão pelos pares

para artigos depositados em servidores *preprint* será decidido pelo conselho editorial da revista.

([https://blog.scielo.org/blog/2019/10/23/periodicos-de-medicina-tropical-doencas-infecciosas-e-parasitarias-alinham-se-as-praticas-editoriais-da-ciencia-aberta/#.Xbh\\_aJpKgDU](https://blog.scielo.org/blog/2019/10/23/periodicos-de-medicina-tropical-doencas-infecciosas-e-parasitarias-alinham-se-as-praticas-editoriais-da-ciencia-aberta/#.Xbh_aJpKgDU))

## Tipos de manuscrito

A Revista convida à publicação os seguintes tipos de manuscritos: Artigos Originais, Artigos de Revisão e Mini revisões, Editoriais, Comunicações Breves, Relatos de Caso, Obituários, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas ao Editor e Números Especiais (Suplementos).

**Artigos Originais:** devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo, título, referências e ilustrações). Manuscritos devem conter resumo estruturado com até 250 palavras, organizado com os seguintes tópicos: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O texto do Manuscrito deve ser organizado incluindo os seguintes tópicos: Título, Título Corrente, Resumo Estruturado, Palavras-Chaves (três a seis), Texto do Manuscrito (Introdução, Métodos, Resultados, Discussão), Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências e as legendas das Figuras. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

**Revisões Sistemáticas e Meta-análises:** Consideramos submissões com revisões sistemáticas e meta-análises como artigos originais. Os autores podem submeter esses manuscritos selecionando a modalidade Artigos Originais. Relatos de revisões sistemáticas e meta-análises devem obedecer às orientações do guia PRISMA (<http://www.prisma-statement.org>) ou outras orientações para desenhos de estudo.

**Artigos de Revisão:** devem apresentar uma revisão crítica de avanços e progressos recentes no estudo das doenças infecciosas/medicina tropical e não apenas uma simples revisão da literatura. Geralmente, os artigos de revisão são a convite do Editor ou Editores Associados. Artigos de Revisão têm o limite de 3.500 palavras (excluindo resumo, título, referências e ilustrações) e devem ser acompanhados de um resumo não estruturado com até 250 palavras. Cinco ilustrações (tabelas e figuras)

são permitidas. A revista também publica mini revisões. Estes artigos têm o limite de 3.000 palavras (excluindo resumo, título, referências e ilustrações) e devem ser acompanhados de um resumo não estruturado de até 250 palavras. As mini revisões podem conter até três ilustrações (tabelas e figuras). O texto do manuscrito deve ser organizado incluindo as seguintes seções: Título, Título Corrente, Resumo (não estruturado), Palavras-Chaves (máximo de cinco), Texto do Manuscrito, Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro, Lista de Referências e legenda das Figuras.

**Editoriais:** usualmente, escritos a convite, considerando o escopo e a política editorial da revista. Têm um limite de 1.500 palavras, sem resumo e palavras-chaves. Devem conter uma ilustração (tabela ou figura), conflito de interesse e uma lista de dez ou menos referências.

**Comunicações Breves:** devem ser relatos sobre novos resultados interessantes ou novas técnicas de pesquisas ou investigações dentro do escopo da revista. As comunicações breves têm o limite de 2.000 palavras (excluindo resumo, título, referências e ilustrações). Devem conter resumo estruturado com no máximo 100 palavras (com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões) e com até 15 referências. Até três ilustrações (tabelas e figuras) são permitidas. Três a seis palavras-chaves devem ser fornecidas. O corpo do manuscrito não deve conter subdivisões ou subtópicos. Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro devem ser incluídos.

**Relatos de Casos:** devem ser relatos breves com limite de 1.500 palavras (excluindo resumo, título, referências e ilustrações), com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências e três palavras-chaves e resumo não estruturado de até 100 palavras. O corpo do manuscrito deve ser dividido de acordo com os seguintes tópicos: Introdução, Relato de Caso, Discussão, Referências e legenda das Figuras. Agradecimentos, Conflito de Interesses, Suporte Financeiro devem ser incluídos.

**Relatórios Técnicos:** devem ser concisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de especialistas. Este tipo de relato será considerado se formatado como um editorial.

**Imagens em Doenças Infecciosas:** devem incluir até três figuras/fotos com a melhor qualidade possível. Até três autores e até três referências são permitidos. O tamanho máximo é de 250 palavras (excluindo título e referências) com ênfase na descrição da figura. O tema



deve envolver alguma lição clínica, contendo descrição apropriada das ilustrações/figuras.

**Cartas ao Editor:** leitores são encorajados a escrever sobre qualquer tópico relacionado a doenças infecciosas e medicina tropical de acordo com o escopo da Revista. Não devem exceder 1.200 palavras, sem resumo e palavras-chaves, com apenas uma inserção (tabela ou figura). Devem discutir assuntos anteriormente publicados na revista, com até 12 referências.

**Números Especiais:** Propostas de números especiais (suplementos) devem ser feitas ao Editor e/ou Editor Convidado. A proposta será analisada levando em consideração o tema, organização do programa, formato científico ou produção de acordo com escopo da revista.

## Preparação do manuscrito

Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que a revisão e publicação de seu manuscrito seja rápida e eficiente. Os editores reservam-se o direito de devolver os manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções.

**Sistema de Submissão *on-line*:** Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão *on-line* no endereço: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>. O autor deve escolher dentro do item "Tipos de Manuscrito" uma categoria para o manuscrito: Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Mini revisões, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas ao Editor, Obituários, Resposta dos autores às Cartas e outros (quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus coautores.

**Carta de Apresentação:** a) deve conter uma declaração que o manuscrito proposto descreve uma pesquisa original e não foi publicada ou está sendo considerada por outro periódico científico. Devem constar, também, que os dados/resultados do manuscrito não são plágio. b) deve ser assinada por todos os autores e, na impossibilidade restrita, o autor principal e o último autor podem assinar em nome dos outros autores. c) Os autores devem incluir

na *Cover Letter* uma declaração de ciência de que o manuscrito, após submetido, não poderá ter a ordem nem o número de autores alterados sem justificativa e/ou informação à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. d) Os autores devem declarar que concordam, caso o manuscrito seja aceito para publicação, transferir todos os direitos autorais para a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Em caso de manuscritos depositados em servidor *preprint*, os autores devem informar na Carta de Submissão qual o servidor, o período e o código DOI.

**Contribuição dos autores:** Os autores devem incluir, em um documento separado, uma ou mais contribuições para cada autor, especificando-as no desenvolvimento do estudo na submissão online. As contribuições dos autores serão publicadas no final do manuscrito.

**Material Suplementar:** É definido como arquivos relacionados a um conteúdo específico, cujos autores disponibilizam para publicação, relacionados aos seus manuscritos. Geralmente, são partes adicionais do artigo que não poderiam ser incluídas no bojo, como apêndices, planilhas, tabelas e figuras que seriam impossíveis de serem apresentadas dentro do artigo. Todo material suplementar será enviado aos revisores para revisão pelos pares. O Editor-Chefe, Editor Associado e de Seção definirão quanto aos limites do material suplementar recebido.

Recomendamos fortemente que o material suplementar seja introduzido no sistema no seguinte formato:

- Preferencialmente no formato PDF ou fornecer link para acessar os arquivos.
- Tabelas e figuras suplementares com cinco ou mais partes, favor disponibilizar um arquivo em PDF com o menor tamanho possível para facilitar o processo de submissão.

## **Formatação do manuscrito**

O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos (Word) e salvo como arquivos .DOC ou .DOCX. A fonte preferencial é *Times New Roman* tamanho 12, com espaço duplo em todo o texto, título/legendas para as figuras, e referências, margens com pelos menos 3cm. O manuscrito deve ser dividido nas seguintes

seções: Cartão de Apresentação (endereçada ao Editor-Chefe), Página de Título, incluindo Título do manuscrito, título corrente, Resumo, Palavras-chaves, Texto do Manuscrito, Declaração de Conflito de Interesses, Agradecimentos, Suporte Financeiro, Lista de Referências, legenda das Figuras. A Carta de Apresentação, Página de Título, Agradecimentos e Suporte Financeiro devem ser incluídos em documentos separados. Abreviações devem ser usadas com moderação.

**Página de Título:** deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, juntamente com afiliações institucionais na seguinte ordem: Instituição dos autores, Departamento, Cidade, Estado e País. Para autores brasileiros, favor não traduzir os nomes das instituições. O endereço completo do autor para correspondência deve ser especificado, incluindo telefone e e-mail. A quantidade de autores e coautores por manuscrito deve ser limitada ao número real de autores que realmente contribuíram com o manuscrito. Exceto para estudos multicêntricos nacionais e internacionais, até vinte autores e coautores serão permitidos. Os nomes dos autores remanescentes serão publicados em notas de rodapé. Forneça o número do ORCID do autor correspondente e de todos os coautores.

**Potenciais revisores:** Os autores devem fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e afiliação institucional) de três potenciais revisores imparciais de uma instituição diferente da dos autores.

**Título:** deve ser conciso, claro e o mais informativo possível. Não deve conter abreviações e não deve exceder a 250 caracteres.

**Título Corrente:** com no máximo 100 caracteres.

**Resumo Estruturado:** deve sumarizar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras e deve ser estruturado com os seguintes tópicos: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. O uso de abreviações deve ser evitado.

**Palavras-chaves:** 3 a 6 palavras chaves devem ser listados imediatamente abaixo do resumo estruturado (Exemplo: Tuberculose. Cuidados primários de saúde. Estrutura de serviços.). Por favor visite o website <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>

**Introdução:** A introdução do artigo deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Estudos prévios devem ser citados somente quando essencial.

**Métodos:** devem ser claros e suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

**Ética:** em caso de pesquisas em seres humanos, os autores devem indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação em seres humanos (institucional, regional ou nacional) e de acordo com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Para experimentação em animais, o autor deve indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa em experimentação animal ou se qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foi seguida. O número de aprovação deve ser enviado à Revista. No caso de pesquisa em seres humanos, os autores devem incluir na seção métodos (subtítulo Considerações Éticas) uma declaração de que o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional.

**Ensaio Clínico:** No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico (Plataforma REBEC).

**Resultados:** devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação (todos os achados relevantes positivos e negativos) revelados pelo estudo. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações e usar a grafia do verbo no passado.

**Discussão:** A discussão deve ser limitada à significância das novas informações e logicamente argumentada, considerando a relevância clínica, importância e limitações do estudo. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto. Mantenha a discussão concisa e relevante. As principais conclusões devem ser apresentadas no último parágrafo.

**Agradecimentos:** devem ser curtos, concisos e restritos àqueles realmente necessários, e que não atendam aos critérios de coautoria. No caso de órgãos de fomento, não usar siglas.

**Conflito de Interesse:** todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

**Suporte Financeiro:** informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

**Referências:** Apenas as referências citadas no texto devem ser incluídas na lista ao final do manuscrito. Devem ser numeradas consecutivamente em ordem progressiva, usando números em arábico, na medida em que aparecem no texto. A lista de referência deve ser formatada de acordo com o estilo Vancouver. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por "et al". Digitar a lista de referências com espaçamento duplo, em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos "em preparação" ou "submetidos para publicação", não devem constar na lista de referência.

Artigos aceitos para publicação devem ser listados como "*in press*" e a carta de aceitação deve ser fornecida. Esse material pode ser incorporado em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte

forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, em ordem numérica crescente, separados por vírgula ou por hífen. Ex.: Mundo<sup>1,2</sup>; Vida<sup>30,42,44-50</sup>. As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no *Index Medicus* (Consulte: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). A responsabilidade pelas citações bibliográficas contidas no texto e na lista de referências recai exclusivamente sobre os autores.

### **Alguns exemplos de referências:**

1. **Citação de Artigos em Geral:** Sobrenome, seguido das iniciais dos seis primeiros autores. Para sete ou mais autores, liste os seis primeiros, seguidos de "et al."), título completo do artigo (no idioma original), título abreviado do periódico (pode ser encontrado Em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>), ano de publicação, volume (número), páginas inicial e final abreviada.

Exemplo 1: Petitti DB, Crooks VC, Buckwalter JG, Chiu V. Blood pressure levels before dementia. *Arch Neurol.* 2005;62(1):112-6.

Exemplo 2: Freitas EC, Oliveira MF, Vasconcelos ASOB, Filho JDS, Viana CEM, Gomes KCMS, et al. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with Chagas disease in an endemic area in northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2016;50(1):115-21.

2. **Capítulo de livro:** Sobrenome, seguido das iniciais dos autores do capítulo, título completo do capítulo, editores, título do livro, Edição, local de publicação: editor, ano de publicação, páginas inicial e final do capítulo abreviada.

Exemplo: Blaxter PS, Farnsworth TP. Social health and class inequalities. In: Carter C, Peel JR, editors. *Equalities and inequalities in health.* 2nd ed. London: Academic Press; 1976. p. 165-78.

3. **Livro:** Sobrenome, seguido das iniciais dos autores do livro, título do livro, edição, local de publicação: editor, ano de publicação e número de páginas do livro.

Exemplo: Carlson BM. *Human embryology and developmental biology.* 4th ed. St. Louis: Mosby; 2009. 541 p.

4. **Sites:** Nome do autor/organização. Título da página [Internet]. Local de publicação: Nome do editor; Data ou ano de publicação [atualizado ano mês dia; Citado ano mês dia]. Disponível em: endereço.

Exemplo: Diabetes Australia. *Diabetes globally* [Internet]. Canberra ACT: Diabetes Australia; 2012 [updated 2012 June 15; cited 2012 Nov

5]. Available from: <http://www.diabetesaustralia.com.au/en/Understanding-Diabetes/DiabetesGlobally/>

5. **Dissertação/Tese:** A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não aceitará a citação de dissertação/mestrado, teses de doutorado ou similar.

6. World Health Organization (WHO). Chemotherapy of leprosy for control programmes. Technical Report Series 675. Geneva: WHO; 1982. 36 p.

7. Ministério da Saúde (MS). Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde - Relatório de Situação: Mato Grosso do Sul. 5ª edição. Brasília: MS; 2011. 39 p.

**Ilustrações:** devem ser submetidas em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (exemplo: Figura 1; Figura 2). Todas as figuras devem ter numeração arábica, citadas no texto, pela primeira vez, em ordem numérica crescente. Autores podem disponibilizar figuras coloridas ou em preto e branco.

**Título e Legendas:** devem ser digitados com espaçamento duplo no final do manuscrito.

**Dimensões:** As dimensões das figuras não devem ultrapassar o limite de 18cm de largura por 23cm de altura. Veja abaixo a correta configuração para cada formato de figura:

- **Imagens/Fotografias:** devem ser obrigatoriamente submetidas em alta resolução no formato **TIFF**. Certifique-se que a mesma foi capturada na resolução mínima de 600 DPI, preferencialmente entre 900-1200dpi, preparadas utilizando programa de Editoração de Imagens (*Adobe Photoshop, Corel Photo Paint, etc*).
- **Gráficos:** Devem ser criados usando software estatístico e devem ser salvos/exportados com a extensão original (**.xls, .xlsx, .wmf, .eps ou .pdf**).
- **Mapas:** devem ser vetorizados (desenhados) profissionalmente, utilizando os *softwares Corel Draw ou Illustrator* em alta resolução.

**Tabelas:** devem ser digitadas com espaçamento simples, com título curto e descritivo (acima da tabela) e submetidas em arquivos separados. Legendas para cada tabela devem aparecer abaixo da mesma. O significado de todas as siglas e símbolos utilizados na tabela devem constar no rodapé da tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, em ordem numérica crescente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo. Tabelas devem ter no máximo 18cm de largura por 23cm de altura, fonte *Arial*, tamanho 9.

**Processo de submissão:** Todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a

via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>, seguindo as instruções no topo de cada tela. O processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

**Sobre Reenvio e Revisões:** a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão reavaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

**Resubmissão:** caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá reenviá-lo. Neste caso, será gerado um novo número para o manuscrito.

**Revisão:** Se os revisores recomendarem rever seu manuscrito, ao devolvê-lo para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

**Após a Aceitação:** Uma vez aceito para publicação, o processo de publicação inclui os passos abaixo:

a) Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, deve retornar para a revista assinado pelos autores.

b) Provas: serão enviadas ao autor responsável, mencionado no endereço para correspondência, no formato PDF, para que o texto seja cuidadosamente conferido. Nesta etapa do processo de edição não serão permitidas mudanças na estrutura do manuscrito. Após os autores receberem as provas, deverão devolvê-las assim que possível.

c) Requerimentos para errata apenas serão aceitos no caso de falha cometida por parte do pessoal técnico da revista.

d) Os artigos aceitos serão disponibilizados na modalidade de publicação contínua na biblioteca SciELO.

**Custos de Publicação:** Não haverá custos de publicação.

A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não indica qualquer tipo de serviços de tradução.

## **Workflow**

### **Workflow do processo de submissão da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**

Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via

eletrônica através do sistema de submissão *online* no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>.

### **Política de Revisão do Periódico (*workflow*):**

1. Todos os manuscritos submetidos para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical são inicialmente avaliados pela Secretaria quanto à adequação do texto às normas do periódico.
2. Após essa etapa, os manuscritos adequados às Normas Para Publicação da Revista serão avaliados pelo Editor, Editores Associados ou Editores de Seção quanto ao escopo e à política editorial do periódico. A Secretaria envia o manuscrito para o Editor-Chefe.
3. O Editor-Chefe (ou Editores Associados/Seção) encaminha o manuscrito aos revisores.
4. Cada manuscrito será enviado a pelo menos dois revisores num sistema duplo-cego para avaliação e emissão de um relatório fundamentado (*peer review*), que será usado pelos Editores para decidir se o manuscrito será aceito ou não. No caso de conflito de pareceres dos revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro parecerista para validar uma decisão final.
5. Comentários dos Revisores (*Free Form Review*) serão encaminhados ao autor correspondente (autor principal para correspondência editorial) para responder aos questionamentos feitos.
6. Os autores devem responder, ponto a ponto, aos questionamentos de cada revisor, destacando com uma cor diferente no texto e devolver a versão revisada do manuscrito de acordo com as normas da revista. A versão revisada será enviada aos revisores, que emitirão um relatório final fundamentado.
7. Os apontamentos dos Revisores e as respostas dos autores serão analisados pelo Editor-Chefe, Editores Associados ou Editores de Seção.
8. O Editor-Chefe emite uma decisão final considerando aceitação ou rejeição do manuscrito.
9. A decisão editorial final é enviada aos autores.
10. Após esta etapa, inicia-se o processo de edição. Os manuscritos aceitos são verificados no iThenticate - Crossref Similarity Check (ferramenta anti-plágio) para verificar sua originalidade e, em seguida, são enviados para a revisão/edição da língua inglesa.
11. A revisão de inglês é enviada aos autores para análise. Os autores devem declarar se aceitam a revisão.
12. Após essa etapa, inicia-se o processo de diagramação. Em seguida, a revista manterá contato com o autor correspondente no que diz respeito às figuras, tabelas, fotografias, mapas, ilustrações e formatação em geral.
13. Os autores declaram formalmente qualquer conflito de interesse, suporte financeiro e cessão de direitos autorais.
14. Provas são enviadas ao autor correspondente para cuidadosa correção, juntamente com todos os coautores quanto à acuidade tipográfica.
15. A versão final de cada manuscrito será disponibilizada em acesso 100% aberto no endereço [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_issues&pid=0037-8682&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_issues&pid=0037-8682&lng=en&nrm=iso)