

MARCUS VINÍCIUS COUTINHO COSSI

**RASTREAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* SPP. EM
INDÚSTRIAS DE PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA E AÇOUGUES
LOCALIZADOS EM MINAS GERAIS, BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

C836r
2014

Cossi, Marcus Vinícius Coutinho, 1985-
Rastreamento e caracterização de *Salmonella* spp. em
indústrias de processamento de carne bovina e açougues
localizados em Minas Gerais, Brasil. / Marcus Vinícius Coutinho
Cossi. – Viçosa, MG, 2014.
xi, 94f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em português e inglês.

Inclui anexos.

Orientador: Luis Augusto Nero.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Microbiologia veterinária. 2. *Salmonella*. 3. Bovino -
Carcças. 4. Alimentos. 5. Açougues. 6. Contaminação
microbiana. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.0896

MARCUS VINÍCIUS COUTINHO COSSI

**RASTREAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* SPP. EM
INDÚSTRIAS DE PROCESSAMENTO DE CARNE BOVINA E AÇOUGUES
LOCALIZADOS EM MINAS GERAIS, BRASIL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Tese apresentada em 21 de fevereiro de 2014:

Luciano dos Santos Bersot

Paulo Sérgio de Arruda Pinto

Maria Aparecida Scatamburlo
Moreira

Fábio Alessandro Pieri

Luís Augusto Nero
(orientador)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais essa conquista e por estar ao meu lado durante todo o caminho. Agradeço imensamente aos meus pais Geraldo Cossi Junior (Junão) e Hosana Celi da Costa Cossi (Hosaninha) por terem acreditado em mim, me apoiado em todos os momentos e me ajudado em minhas decisões, tenham a certeza que sem o apoio de vocês, financeiro ou para uma simples conversa, não sei se estaria completando mais esta etapa de minha vida. Agradeço de todo o coração também ao meu irmão Magnus Augusto Coutinho Cossi (Mag), pois foi com você que morei todo este tempo e foi você que aturou o mau humor dos dias ruins e compartilhou comigo todos os dias de felicidade. Um agradecimento especial também à minha namorada Iara de Castro e Oliveira (Iaiá) que me incentivou, aconselhou e com toda a paciência possível têm me ajudado todos estes anos. Muito obrigado ao meu orientador prof. Nero que, novamente, foi fundamental na elaboração e desenvolvimento deste trabalho, sem dúvida alguma, é um ótimo orientador. Não poderia deixar de agradecer à todos os integrantes do nosso laboratório que ajudaram diretamente nesta pesquisa (Mari, Lafisca, Diou, Fred, Japa Bob, Tácio, Naty, Petrônio, Danilo) e também nas horas de descontração (Val, Raquel, Eduardo, Rodrigo, Luana, Monique, Thalitinha, Aline, Vivian, Pedro, Fábio, Camila, Letícia e Emílio). Obrigado a toda a minha família, tios, tias, primos, Vó Carmen, Vô Walter, Vó Therezinha e Vô Geraldo. Obrigado a todos os grandes amigos da veterinária (e agregados) e de Mococa. Por último, Agradeço a Universidade Federal de Viçosa, o Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária e todos os professores e técnicos que sempre me auxiliaram. Finalmente, aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPEMIG, pela concessão de bolsa de estudo e financiamento do projeto de pesquisa. Muito Obrigado de todo o coração, amo vocês.

CONTEÚDO

LISTA E TABELAS	vii
LISTA DE FIGURA	vii
RESUMO	vii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
1. Importância da carne bovina	3
2. Contaminação microbiológica da carne e possíveis rotas de contaminação.....	7
3. Ferramentas utilizadas na detecção e caracterização da <i>Salmonella</i> spp.....	11
4. PFGE e <i>Salmonella</i> spp.....	14
5. Referências	15
OBJETIVOS	26
Objetivo geral.....	26
Objetivos específicos	26
CAPÍTULO 1. Low occurrence of <i>Salmonella</i> in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: from bovine hides to end cuts.....	27
Title page.....	28
Abstract	29
1. Introduction	30
2. Materials and Methods	31
2.1. Slaughterhouses and sampling	31
2.2. <i>Salmonella</i> detection	32
2.3. <i>Salmonella</i> fingerprinting	33
2.4. Data analysis	34
3. Results and Discussion.....	34
Acknowledgements	38
References	38
CAPÍTULO 2. Antimicrobial Resistance and Virulence Profiles of <i>Salmonella</i> Isolated from Butcher Shops in Minas Gerais, Brazil.....	45
Title page.....	46
ABSTRACT	47
INTRODUCTION	48
MATERIAL AND METHODS	49

Butcher shop selection and sampling	49
<i>Salmonella</i> spp. detection.....	50
<i>Xba</i> I macrorestriction and Pulsed Field Gel Electrophoresis.	51
Virulence genes.....	51
Antimicrobial resistance.....	52
RESULTS AND DISCUSSION	53
ACKNOWLEDGMENTS	56
REFERENCES.....	57
CAPÍTULO 3. Uso associado de técnicas genotípicas e fenotípicas para agrupamento de <i>Salmonella</i> spp obtidos de frigoríficos em Minas Gerias, Brasil.	66
Resumo.....	67
1. Introdução	68
2. Material e Métodos	69
2.1. Micro-organismos	69
2.2. Identificação de genes associados à patogenicidade	70
2.3. Resistência a antimicrobianos	71
2.4. Análise de dados	71
3. Resultados e Discussão	72
Referências Bibliográficas	76
CONCLUSÕES GERAIS	83
ANEXOS	84

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1. Frequencies of positive results for *Salmonella* spp. obtained from 209 bovine carcasses at four steps of slaughtering (I: from hide; II: after skinning; III: after evisceration; IV: after end washing) from three slaughterhouses (Sl01, Sl02, Sl03) located in Minas Gerais state, Brazil. 43

CAPÍTULO 2

Table 1. Frequencies of positive results for *Salmonella* spp. in surface samples of environmental points from four butcher shops located in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. 63

Table 2. Minimum inhibitory concentration values ($\mu\text{g/mL}$) and resistance patterns (R: resistance, I: intermediate resistance, S: sensitivity) of *Salmonella* spp. strains isolated from chopping boards from four distinct butcher shops located in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil, related to distinct antimicrobial substances. Results obtained by Etest® stripes (bioMérieux); AB: absence of halo formation, indicating resistance. 64

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Tabela indicando os primers utilizados para cada gene relacionado à patogenicidade..... 80

Tabela 2. Resultado da comparação entre pulsotipos e presença de genes de virulência de isolados de *Salmonella* spp..... 81

Tabela 3. Resultados da comparação entre pulsotipos e perfis de resistência a antimicrobianos de isolados obtidos no frigorífico..... 82

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figure 1. Schematic representation of the obtained PFGE pulsetypes after DNA macrorestriction (*Xba*I) of 20 *Salmonella* spp. isolates obtained at four steps of slaughtering (I: from hide; II: after skinning; III: after evisceration; IV: after end washing) from three slaughterhouses (SI01, SI02, SI03) located in Minas Gerais state, Brazil. Also, identification of their serotypes. Similarities between the identified PFGE pulsetypes were estimated using the Dice coefficient (5% tolerance). 44

CAPÍTULO 2

Figure 1. Schematic representation of the obtained PFGE pulsetypes after DNA macrorestriction (*Xba*I) of 15 *Salmonella* spp. isolates obtained from chopping boards from 4 distinct butcher shops, after 8 visits for sampling, and results for the occurrence of virulence genes (*sefA*, *invA*, and *spvC*) detected by PCR. Similarities between the identified PFGE pulsetypes were estimated using the Dice coefficient (5% tolerance). 65

CAPÍTULO 3

Figura 1. Apresentação esquemática dos pulsotipos obtidos por PFGE após a macrorestrição do DNA (*Xba*I) de 20 isolados de *Salmonella* spp. obtidos na carcaça de bovinos abatidos em frigoríficos localizados em Minas Gerais, Brasil. Perfis de similaridade entre os isolados de *Salmonella* spp foram estimados através do coeficiente Dice (5% de tolerância). Figura adaptada de Cossi et al. (2014). 79

RESUMO

COSSI, Marcus Vinícius Coutinho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2014. **Rastreamento e caracterização de *Salmonella* spp. em indústrias de processamento de carne bovina e açougues localizados em Minas Gerais, Brasil.** Orientador: Luís Augusto Nero. Co-orientador: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

Considerando a importância de *Salmonella* spp. para a saúde pública, o presente estudo tem como objetivo avaliar origens e rotas de contaminação da carne bovina, através da pesquisa deste patógeno em pontos críticos de contaminação da linha de processamento em frigoríficos e açougues. Para a realização deste estudo, amostras foram coletadas em três frigoríficos localizados em Minas Gerais, Brasil, sendo coletado um total de 209 carcaças de bovinos, amostrados em quatro pontos da linha de abate (couro; após a esfolagem; após a evisceração; após o enxágue final). Amostras foram obtidas também de quatro açougues localizados em Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Nestes açougues foram coletadas 32 amostras de cada um dos seguintes utensílios: mãos, tábua de corte, faca, assoalho da gôndola de refrigeração, moedor de carne e amaciador de carne. Isolados confirmados como *Salmonella* spp. por PCR (gene *ompC*) foram submetidos a macrorestrição do DNA com *Xba*I e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), além de testes de sensibilidade a antimicrobianos e de presença de genes associados à patogenicidade. Na pesquisa realizada em frigoríficos, *Salmonella* spp. foi identificada no couro de seis animais, na carcaça de um animal após a esfolagem, duas carcaças após a evisceração e três carcaças após o enxágue final. Os isolados foram identificados como sendo pertencentes aos sorotipos Dublin, Derby, Infantis, Give e *Salmonella enterica* subsp. *salamae*. A análise de PFGE dos 20 isolados obtidos permitiu a definição de contaminações cruzadas entre diferentes frigoríficos e etapas do abate. Estes resultados mostram a baixa ocorrência

de *Salmonella* spp nos frigoríficos de Minas Gerais, Brasil, porém indica possíveis rotas de contaminação por este patógeno. Nos açougues, *Salmonella* spp. foi identificada em cinco amostras superficiais de tábuas de corte de carne. Os 15 isolados obtidos foram distribuídos em quatro pulsotipos pela técnica de PFGE. O gene de virulência *invA* foi encontrado em 13 isolados, o gene *sefA* em oito isolados. Todos os isolados analisados foram resistentes ao antimicrobiano clindamicina e sensíveis a amicacina e cefotaxina, e simultaneamente resistentes a pelo menos três antimicrobianos. Os resultados demonstram a importância da tábua de corte de carne como fonte de contaminação por *Salmonella* spp. em açougues e a presença dos genes de virulência e resistência a múltiplas drogas evidenciam o risco que esse patógeno representa para a saúde pública. Finalmente, os sorotipos e os perfis genéticos dos isolados obtidos nos frigoríficos foram comparados com perfis de resistência a 13 antimicrobianos e com a presença de genes de virulência localizados em ilhas de patogenicidade do micro-organismo (Grupo 1), plasmídeos (Grupo 2) ou outras regiões do DNA (Grupo 3). O resultado desta análise mostrou que os isolados com um mesmo perfil de restrição foram classificados em um mesmo sorotipo. Além disso, genes de virulência dos Grupos 1 e 2 mostram ser bastante conservados entre isolados pertencentes a um mesmo pulsotipo. O perfil de sensibilidade apresentado pelos isolados também foi muito similar entre isolados pertencentes a um mesmo pulsotipo, indicando que a utilização concomitante de técnicas fenotípicas e genotípicas pode auxiliar no agrupamento e consequentemente no estudo de surtos e na identificação de possíveis rotas de contaminação. Apesar da baixa ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaça e em ambientes de manipulação de alimentos, a presença de genes de virulência e a existência de isolados resistentes a múltiplos antimicrobianos evidenciam a importância deste patógeno para a saúde pública.

Além da identificação e caracterização da *Salmonella* spp, a utilização de técnicas fenotípicas e genotípicas podem auxiliar diretamente na identificação de origens e possíveis rotas de contaminação dos produtos finais.

ABSTRACT

COSSI, Marcus Vinícius Coutinho, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Rastreability and characterization of *Salmonella* spp from bovine processing industries and butcher shop localized in Minas Gerais, Brazil.** Advisor: Luís Augusto Nero. Co-advisor: Paulo Sérgio de Arruda Pinto.

As *Salmonella* spp is still one of the most important foodborne pathogen related to public health, the aim of this study was to identify the contamination routs in beef chain production, through the identification of the pathogen in critical points of contamination on slaughterhouses and butcher shops. 3 slaughterhouses located in Minas Gerais state, Brazil, were considered in this study to obtain 209 carcasses samples in 4 steps of the slaughtering (bovine hide; after skinning, after evisceration and after the end wash). Also, samples were obtained from 4 butcher shops located in Viçosa, Minas Gerais, Brazil. On these facilities, 32 samples were obtained from each of the utensils: employees hands, cutting boards, knives, refrigeration rooms, meat grinders and meat tenderizers. *Salmonella* spp isolates were submitted to DNA macrorestriction (*Xba*I) and pulse field gel electrophoresis. Also, virulence genes and antimicrobial resistance were tested. *Salmonella* was identified from hide of 6 animals, 1 carcass after skinning, 2 carcasses after evisceration and 3 carcasses after end wash. These isolates were confirmed as serotypes Dublin, Derby, Infantis, Give and *Salmonella enterica* subsp. *salamae*. PFGE analysis of the 20 isolates showed the occurrence of cross contamination between slaughterhouses and also between steps of the slaughtering. This result shows the low occurrence of *Salmonella* spp in slaughterhouse in Minas Gerais state, Brazil, and also the possible routs of contamination. At the butcher shops, 5 cutting boards were positive for *Salmonella* spp. From these positive samples, 15 isolates were obtained with 4 different pulsotypes after PFGE analysis. The virulence gene *invA* was present in 13 isolates,

the gene *sefA* was present in 8 isolates. All the isolates showed resistance for clindamycin, sensibility for amikacin and cefotaxime and all presented resistance to at least 3 tested antimicrobial profiles. This result shows the importance of the cutting board as a contamination route for *Salmonella* spp. and the presence of virulence genes and multidrug resistance highlight the importance of *Salmonella* spp. for the public health. Finally, the serotypes and pulsotypes from the isolates obtained on the slaughterhouses were compared to the virulence genes and antimicrobial resistance profiles. The virulence genes tested were located in three different genomic regions: pathogenic island (Group 1), plasmids (Group 2) and other DNA sites (Group 3). The analysis of this results showed that all the isolates from the same pulsotype had the same serotype. Also, virulence genes of the Group 1 and 2 showed to be very conserved between isolates from the same pulsotype. Antimicrobial resistance profiles also showed to be very conserved in isolates belonging to the same pulsotype, enhancing how the use of genotype and phenotype techniques can be helpful on *Salmonella* spp grouping. As a conclusion, besides the low occurrence of *Salmonella* spp in carcasses and environment handling foods, the presence of virulence genes and multidrug resistance shows how *Salmonella* spp is still an important foodborne pathogens associate with contaminated food. This study also shows how the association of genotype and phenotype technique can be greatly helpful during outbreaks investigation.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se observado um aumento da produção e exportações no agronegócio brasileiro e queda nas importações, resultando em um superávit na balança comercial. Um dos responsáveis por este resultado comercial positivo tem sido a pecuária brasileira, e mais especificamente o comércio de carne bovina, sendo o Brasil o maior exportador e segundo maior produtor mundial.

O fato de o Brasil ser o maior exportador de carne bovina significa que padrões de qualidade estipulados pelos países importadores devem ser atendidos para que se possa garantir o fornecimento de carne para estes mercados. Uma das formas de se garantir a qualidade e segurança dos produtos é através da contagem de micro-organismos indicadores de higiene e ainda, a identificação de patógenos relacionados à carne bovina, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Dentre esses, *Salmonella* spp. é considerado o patógeno mais frequentemente associado à toxinfecções em seres humanos causadas por ingestão de alimentos contaminados.

Salmonella spp. pode contaminar a carne bovina e seus derivados em diversas etapas do processamento, sendo as principais: couro do animal antes do abate, a evisceração, pois há risco de perfuração da alça intestinal, e ainda os utensílios e equipamentos utilizados em ambientes de manipulação, como sala de desossa e açougues. Especificamente nesses locais há intensa manipulação da carne bovina, e conseqüentemente alto risco de contaminação cruzada.

Por este patógeno estar diretamente relacionado à saúde pública, o monitoramento da contaminação por *Salmonella* spp. durante toda a cadeia de processamento da carne bovina é importante, e para isso técnicas moleculares rápidas

e confiáveis são extremamente úteis para identificação e caracterização adequadas deste micro-organismo. Dentre as técnicas moleculares mais utilizadas neste sentido estão a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e o *multilocus sequence typing* (MLST), que são capazes respectivamente de relacionar corretamente a contaminação e sua origem na linha de processamento e identificar a evolução genética deste patógeno.

A pesquisa por genes relacionados a patogenicidade de *Salmonella* spp., assim como os perfis de resistência a antimicrobianos, são também importantes para o entendimento do real risco da presença deste patógeno na carne bovina, principalmente porque tem-se identificado muitos isolados multirresistentes à antimicrobianos o que torna o tratamento de pessoas contaminadas cada vez mais difícil. Pesquisas nesta área possuem uma alta aplicabilidade prática, uma vez que a utilização de técnicas moleculares auxilia na identificação das origens da contaminação e suas possíveis rotas, assim como a identificação de genes de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos traduzem o real risco para a saúde pública.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Importância da carne bovina

Entre 2012 e 2013 observou-se um aumento de 1% nas exportações relacionadas ao agronegócio brasileiro, o que representa um valor de 846 milhões de dólares. Neste mesmo período, a importação de produtos agropecuários apresentou uma queda de 6,2%, resultando em um superávit recorde de 79 bilhões de dólares, o que demonstra a força do agronegócio brasileiro e sua competitividade internacional (Brasil, 2013a). As projeções apresentadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), apontam para um cenário bastante otimista para os próximos 10 anos. Segundo o MAPA, o setor agropecuário terá uma produção capaz de abastecer anualmente 200 milhões de brasileiros e seus excedentes serão exportáveis para mais de 200 países (Brasil, 2013b).

Dentro da balança positiva do agronegócio brasileiro, a pecuária representa um importante papel. Em 2012 foi abatido um total de 31,1 milhões de cabeças de gado, sendo Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, São Paulo e Minas Gerais, respectivamente, os líderes em abate no país (Brasil, 2013b). A atual produção total de carnes no país é de 26,5 milhões de toneladas, sendo que a carne bovina representa aproximadamente 33% deste total e segundo projeções passará por um aumento total de 22,5% até 2023 (Brasil, 2013b). Em relação ao consumo, as projeções do MAPA indicam que a carne bovina será aquela que passará por maior aumento nos próximos 10 anos, na ordem de 42,8%. A carne de frango passará para o segundo lugar no aumento do consumo, com um crescimento de 26,2%, e o terceiro lugar em crescimento será da carne suína com 18,9% (Brasil, 2013b).

As projeções de crescimento em produção realizadas pelo MAPA são importantes, uma vez que a Organização das Nações Unidas (ONU) estima que a população mundial seja superior a 9 bilhões de pessoas, das quais 2 bilhões são mal nutridos e 840 milhões estejam passando fome (ONU, 2013a; ONU, 2013b). Porém, é evidente que o aumento na produção de alimentos não é garantia do fornecimento de alimentos para toda a população, pois, outros aspectos, como políticos e econômicos, estão envolvidos.

No entanto, esse cenário poderia ser ainda pior se a produção de alimentos não tivesse aumentado nos últimos anos (FAO, 2010). Nos países em desenvolvimento, por exemplo, tem-se observado nas últimas duas décadas um aumento considerável na produção de carne e ovos. Mesmo assim, somente 22% da proteína da dieta são de origem animal, enquanto que nos países desenvolvidos esse valor é de 60% (D'Silva, 2000). Portanto, fica evidente a necessidade de aumentar essa cifra, especialmente nos países em desenvolvimento, e principalmente controlar os desperdícios (FAO, 2009).

No Brasil, a criação dos bovinos de corte é feita basicamente de maneira extensiva, o que sujeita parte do rebanho à escassez periódica de forragem, comprometendo seu desenvolvimento e concentrando uma maior oferta de carne em determinada época do ano (EMBRAPA, 2003). Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), das estimadas 30 milhões de cabeças abatidas anualmente no país, somente 8,6% provêm de animais confinados (ABCZ, 2014; ABIEC, 2011).

Na criação extensiva praticada no Brasil, mesmo com a intensa seleção a que foi submetido parte do rebanho zebuino, o abate dos animais sempre é tardio, nunca ocorrendo antes dos 24 meses de idade (Arrigoni, 2001; Baptista et al., 1999).

Mesmo com este perfil de produção, o Brasil é hoje o segundo maior produtor e o maior exportador de carnes do mundo (ABIEC, 2012).

A carne bovina brasileira é exportada para mais de 100 países em diversas regiões do mundo (Brasil, 2013b). Essa grande variação de mercados importadores impõe diferentes padrões de qualidade e higiene que devem ser atingidos. De forma geral, os cortes destinados ao mercado externo devem ser analisados quanto à presença de micro-organismos deteriorantes e patogênicos, devendo atender a diferentes critérios microbiológicos estabelecidos pelos países importadores, como os membros da Comunidade Europeia (EU, 2007), critérios estes que caso não atendidos podem limitar a venda destes produtos.

Para a obtenção de um alimento seguro deve ser enfatizado que os cuidados devem ter início na fase primária de produção (Buncic et al., 2013). Dentro deste contexto, sistemas como Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) apresentam-se como alternativas a serem empregadas já na produção primária, pois têm como fundamentos a prevenção dos perigos químicos, físicos e biológicos, porém, entendendo que este tipo de aplicação seria na forma de adaptações desses programas (Gaaloul et al., 2011; Osés et al., 2012). Nos países desenvolvidos já há uma mentalidade voltada para sua adaptação e implantação nas fazendas através de programas do tipo “from farm to fork”, que numa tradução livre seria a produção de alimentos seguros envolvendo todas as etapas de produção, isto é, “da fazenda ao garfo do consumidor” (Buncic et al., 2013; Cullor, 1995).

Nos últimos anos ainda, muitos estudos e normatizações têm sido propostos por instituições internacionais como *Codex Alimentarius* e Organização Mundial da Saúde, com o intuito de ajudar os profissionais envolvidos com

segurança e qualidade dos alimentos (Gaaloul et al., 2011). De uma maneira geral, as ferramentas de controle de qualidade baseiam-se na exigência de um *layout* mínimo de processamento que facilite o monitoramento, na responsabilidade do estabelecimento de aplicar a ferramenta de qualidade, e na presença de uma autoridade responsável pela fiscalização (Ababouch, 2000). Neste sentido, mesmo sendo muito eficaz, o próprio APPCC é, segundo o *Codex Alimentarius*, apenas uma parte dos princípios de verificação do sistema de produção (Luning et al., 2009).

Os sistemas de controle de qualidade utilizados na produção de carne bovina levam em consideração diferentes parâmetros microbiológicos a fim de se verificar a qualidade e inocuidade final dos produtos obtidos (Buncic et al., 2013; Serraino et al., 2012). Vários micro-organismos indicadores são utilizados para esse fim, como os aeróbios mesófilos e coliformes. A Comunidade Européia, por exemplo, determina a enumeração de aeróbios mesófilos e enterobactérias, além de pesquisa do patógeno *Salmonella* spp., em carcaças bovinas como medidas de verificação da qualidade microbiológica do processo de abate (EU, 2007). No Brasil, além dos padrões exigidos pelos países importadores, existe ainda o padrão estipulado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária para carne *in natura* que exige a ausência de *Salmonella* spp em 25 gramas de produto e contagem máxima de coliformes a 45°C de 10^4 por grama (ANVISA, 2001).

Micro-organismos de uma maneira geral, teoricamente, não deveriam estar presentes no tecido muscular, uma vez que estes tecidos são considerados estéreis em animais sadios (Rivera-Betancourt et al., 2004). No entanto a contaminação acaba ocorrendo durante o processamento e manipulação, sendo que falhas durante a esfolagem, evisceração, processamento de cortes, embalagem, estocagem e distribuição dentro de um frigorífico e para pontos comerciais podem intensificar

esta contaminação (Dong et al., 2014; Gill, 1998). Fezes são consideradas como as principais fontes de contaminação e podem atingir a carcaça por deposição direta, e até mesmo por contato indireto com carcaças contaminadas, equipamentos, trabalhadores, instalações e ar (Borch & Arinder, 2002; Dong et al., 2014).

2. Contaminação microbiológica da carne e possíveis rotas de contaminação.

Nas últimas décadas, tem-se observado um grande aumento na incidência de doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados e segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que anualmente 2,2 milhões de pessoas tenham diarreia associada ao consumo de alimentos ou água contaminada (Ahmed & Shimamoto, 2014).

Níveis de contaminação por aeróbios mesófilos abaixo de 10^5 UFC/cm² indicam boas condições de higiene durante o abate e contaminação de carnes em níveis acima de 10^6 UFC/cm² indicam início de processo de deterioração, com produção de odores típicos e redução do tempo de prateleira. Quando o nível de contaminação atinge valores da ordem de 10^7 UFC/cm² a formação de limosidade já é evidente (Gill et al., 1998).

O modo mais eficiente de se reduzir a contaminação e desenvolvimento microbiano em produtos cárneos é o estabelecimento de programas de controle de qualidade como BPF e APPCC, que podem ser conduzidos pela enumeração de micro-organismos indicadores de higiene que remetem a práticas adequadas de processamento, além de sugerir a presença de patógenos e micro-organismos causadores de deterioração (Gaaloul et al., 2011; Osés et al., 2012).

A inocuidade e a qualidade de produtos cárneos podem ser estimadas através da pesquisa de diversos micro-organismos indicadores, como os aeróbios mesófilos e coliformes. A enumeração de aeróbios mesófilos fornece uma estimativa da população geral de micro-organismos que estão presentes nos produtos cárneos, e altos níveis de contaminação estão associados à baixa qualidade (Gill, 1998). Coliformes, principalmente *Escherichia coli*, geralmente são associados à contaminação por matéria de origem fecal e sugerem a presença de patógenos de origem entérica (Eisel et al., 1997; Wong & Selvam, 2009).

Apesar de alguns micro-organismos indicadores sugerirem a presença de certos perigos microbiológicos, a pesquisa efetiva de patógenos é fundamental para garantia da segurança microbiológica de produtos cárneos. Assim, patógenos frequentemente associados à carne bovina devem ser pesquisados e controlados na linha de abate e processamento, como *Salmonella* spp. (Carrasco et al., 2012). Micro-organismos desse gênero são patogênicos para humanos e outros animais quando ingeridos por via oral, possuem um período de incubação médio de 12-36 horas, e provocam enterite, infecção sistêmica e febre entérica (Altekruse et al., 2006; Turki et al., 2012).

A incidência de salmoneloses tem aumentado significativamente durante as duas últimas décadas, em todo o mundo (Favier et al., 2013; Narvaez-Bravo et al., 2013). Geralmente, os humanos são infectados por *Salmonella* spp. através da ingestão de água e alimentos contaminados, podendo ocorrer transmissão também via contato direto com animais contaminados (Choi et al., 2013; Dong et al., 2014; Rasschaert et al., 2007; Wang et al., 2013b).

Particularmente a pesquisa e caracterização de patógenos na linha de abate e processamento permite a identificação da origem da contaminação dos

mesmos em produtos cárneos finais, como cortes embalados e destinados ao consumo humano (Barco et al., 2013). Estudos epidemiológicos dessa natureza são fundamentais para se determinar quais são as principais fontes de contaminação desses patógenos na linha de abate e processamento, a fim de se propor medidas efetivas de controle e higienização (Favier et al., 2013).

Algumas etapas da linha de abate de bovinos são consideradas importantes fontes de contaminação da carcaça durante o processamento (Carrasco et al., 2012). A etapa de retirada da pele do animal é um dos pontos mais importantes, pois a carga microbiana da pele irá refletir diretamente o nível de contaminação inicial que a carcaça irá apresentar no começo do abate e a avaliação macroscópica de sua limpeza tem sido utilizada como indicador indireto do real risco de contaminação da carne (Arthur et al., 2007; Hauge et al., 2012; Narvaez-Bravo et al., 2013).

Além da contaminação externa, a etapa de evisceração também é considerada fundamental no controle da contaminação da carcaça pois, uma falha de processamento poderá resultar no rompimento de vísceras e consequente contaminação da carne (Buncic & Sofos, 2012). Outra etapa que tem sido apontada por outros autores como importante fonte de contaminação da carcaça é o enxágue final da carcaça antes de ser estocada nas câmaras frias (Barkocy-Gallagher et al., 2003; Rivera-Betancourt et al., 2004; Ruby et al., 2007).

Além da pesquisa de patógenos na linha de abate, pesquisadores acreditam que seja fundamental a análise de ambientes responsáveis pela manipulação dos cortes finais como sala de desossa e açougues (Schwaiger et al., 2012; Stevens et al., 2006). Ambos ambientes têm em comum o fato de manipularem diferentes cortes, de diferentes origens e em alguns casos manipular carnes de mais

de uma espécie como bovinos, suínos e aves (Voidarou et al., 2011). A manipulação de carnes de diferentes origens e de diferentes espécies de animais representa um potencial risco de contaminação cruzada e consequentemente um risco para a população consumidora (Gomes-Neves et al., 2012). Outros pontos como mesas, facas, moedores de carne e mãos dos funcionários são considerados importantes rotas de contaminação cruzada, sendo possíveis fontes de contaminação para o produto final (Carrasco et al., 2012; Haileselassie et al., 2013; Papadopoulou et al., 2012).

Dentro da cadeia de produção da carne, os açougues possuem um importante papel nesta rota de contaminação, pois são considerados um dos pontos mais próximos entre a produção da carne e o consumidor final. Além disso, pode-se encontrar nestes estabelecimentos mão de obra com pouca qualificação, o que é apontando por alguns autores como um dos facilitadores da contaminação cruzada (Haileselassie et al., 2013).

A contaminação cruzada ocorre normalmente pelo contato de superfícies incorretamente higienizadas e o produto final e segundo a organização mundial da saúde, é responsável por 25% das toxinfecções alimentares. Possíveis formas de haver contaminação cruzada são práticas incorretas de higienização, equipamentos contaminados, manipulação dos alimentos, erro de processamento ou estocagem inadequada (Møretrø et al., 2012).

Outro problema que coloca em risco a saúde pública e que também está relacionado à contaminação cruzada é a capacidade de alguns micro-organismos, como *Salmonella* spp, de formarem uma complexa estrutura conhecida como biofilme (Wang et al., 2013a). Esta capacidade que algumas bactérias possuem de formar biofilmes faz com que muitas das técnicas de higienização adotadas nas indústrias e estabelecimentos que comercializam carne não sejam eficientes na

remoção destes micro-organismos (Lianou & Koutsoumanis, 2012; Wang et al., 2013a).

3. Ferramentas utilizadas na detecção e caracterização da *Salmonella* spp.

Devido à importância já apresentada de *Salmonella* spp. para a saúde pública e suas diversas rotas de contaminação da carcaça e produto final, é imprescindível a utilização de ferramentas eficazes na identificação deste patógeno e suas características como a presença de genes relacionados à patogenicidade e resistência a antimicrobianos (Campioni et al., 2012). Além disso, ferramentas específicas podem ser utilizadas para associar com precisão os mesmos agentes patogênicos presentes em alimentos e os causadores de enfermidades em humanos, sendo importantes para que medidas preventivas e corretivas sejam realizadas, a fim de se evitar novos casos e surtos (ICMSF, 2006).

Para detecção e caracterização de *Salmonella* spp. em amostras de alimentos, a reação da polimerase em cadeia (PCR) tem sido a opção mais utilizada pois, é considerada uma técnica bastante eficiente, rápida e mais confiável que a metodologia convencional (Park et al., 2014). Por outro lado, a PCR possui a desvantagem de ser mais cara que a metodologia baseada no desenvolvimento de *Salmonella* spp. em meios de cultura, e principalmente por ser impossível verificar se a região do DNA amplificada foi originado de uma célula viável presente na amostra (Cocolin et al., 2011; Park et al., 2014).

Entretanto, a presença de *Salmonella* spp. nos alimentos não é hoje a única preocupação. Nos últimos anos, muitas cepas isoladas de *Salmonella* spp. têm se mostrado resistentes a diversos agentes antimicrobianos o que se deve

principalmente ao uso indiscriminado dos antimicrobianos na criação dos animais de produção e a pressão seletiva assim provocada (Carramiñana et al., 2004; Hur et al., 2012; Van et al., 2012). As consequências desse resultado afetam diretamente a saúde pública pois, cada vez mais, os medicamentos utilizados no combate à toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* spp. se tornarão ineficazes (Oliveira et al., 2005).

Além da resistência a antimicrobianos, a pesquisa por genes de virulência também é considerada importante, pois oferece um dimensionamento da patogenicidade dos isolados de *Salmonella* spp. associados com alimentos. Os genes de virulência estão distribuídos pelo cromossomo desse micro-organismo, sendo muitos deles encontrados em isolados patogênicos, não patogênicos e mesmo em *Escherichia coli*; considerando essa situação específica, esses genes não são bons candidatos para identificação de *Salmonella* spp (Skyberg et al., 2006). Os genes normalmente avaliados em isolados de *Salmonella* spp são: *invA*, *orgA*, *prgH*, *spaN*, *sipB*, *sitC*, *pagC*, *msgA*, *spiA*, *sopB*, *lpfC* e *sifA*, que estão localizados na ilha de patogenicidade distribuída em variadas partes do DNA bacteriano; genes *pefA* e *spcB* que são tipicamente carregados por plasmídeos; e os genes *iroN*, *tolC* e *cdtB* que estão localizados em outras regiões do genoma microbiano (Skyberg et al., 2006).

Uma das primeiras etapas relacionada a patogenicidade da *Salmonella* spp. é sua capacidade de aderir às células do hospedeiro. Neste sentido, o gene *sefA* está associado com a produção de fímbrias e com a adesão do micro-organismo à certas regiões do aparelho gastrointestinal do hospedeiro, mais especificamente à região da placa de Peyer no intestino delgado (Liu et al., 2011a; Musa et al., 2013).

A capacidade de invasão das células epiteliais do intestino é também uma das etapas primordiais associada a patogenicidade da *Salmonella* spp., sendo os gene

invA, *spaN*, *sipB*, *tolC*, *prgH* e *orgA* responsáveis por esta atividade (Galan & Curtiss III, 1989; Groisman & Ochman, 1997). Além disso, estudos demonstram que micro-organismos com estes genes também são capazes de induzir apoptose em macrófagos infectados, indicando assim, a relação destes genes também com esta capacidade (Groisman & Ochman, 1997).

Os genes de virulência *pagC*, *spiA*, *sifA* e *msgA*, são responsáveis pela capacidade de sobrevivência e multiplicação do patógeno dentro das células do hospedeiro, não sendo no entanto, necessário para a invasão das células epiteliais (Almeida et al., 2013; Behlau & Miller, 1993; Groisman & Ochman, 1997).

Outro grupo de genes associados diretamente com a capacidade patogênica de *Salmonella* spp. são os genes *spvC* e *spvB*. Esses genes são associados com a sobrevivência do patógeno dentro da célula do hospedeiro, e ainda possuem a capacidade de inibir o sistema imune inato do hospedeiro (Kaeppeli et al., 2011; Paul A. Gulig et al., 1993). Outro mecanismo relacionado com a patogenicidade de *Salmonella* spp. é conhecido como sistema de secreção tipo III. Este mecanismo, que possui como um de seus reguladores o gene *sopB*, tem a função de depositar na célula do hospedeiro fatores de virulência essenciais no processo de invasão, sendo assim considerado um dos genes principais para a patogenicidade do micro-organismo (Roblin et al., 2013).

Finalmente, os genes *iroN* e *sitC* são responsáveis pela codificação de uma proteína receptora de ferro na parte externa da membrana e o gene *cdtB* está relacionado com a produção de toxinas (Baumler et al., 1998; Haghjoo & Galan., 2004; Janakiraman & Schlauch., 2000).

4. PFGE e *Salmonella* spp.

Novas técnicas moleculares têm auxiliado os pesquisadores e responsáveis pelo controle da qualidade microbiológica dos alimentos a identificar com precisão a origem da contaminação e consequentemente a prevenção de novas falhas no processamento (Park et al., 2014). Dentre as técnicas utilizadas com sucesso para esta função esta a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (Almeida et al., 2013; Torpdahl et al., 2005).

A PFGE se apresenta como uma boa alternativa no estudo epidemiológico de isolados de micro-organismos pois, consiste na comparação de fragmentos do DNA bacteriano que foi previamente digerido por enzimas de restrição (Almeida et al., 2013; Foxman et al., 2005). Esta técnica fornece como resultado um padrão de bandas que pode ser comparado entre os isolados, têm um tempo de realização relativamente curto e é considerada de alta capacidade discriminatória entre os isolados (Liu et al., 2011b; Perez-Losada et al., 2013). Porém, acredita-se que por ser necessário um elevado nível de conhecimento técnico para traduzir e interpretar os padrões de banda possa haver equívocos na análise de alguns pesquisadores (Perez-Losada et al., 2013).

Torpdahl et al. (2005) analisaram 110 isolados de *Salmonella entérica* através da técnica de PFGE e micro-organismos de um mesmo sorotipo obtiveram pulsotipos diferentes. Este resultado corrobora com a afirmação de outros autores de que o PFGE é mais discriminatório na comparação de isolados (Favier et al., 2013; Mohamed et al., 2014).

Favier et al. (2013) analisaram 27 isolados de *Salmonella* spp. através da técnica de PFGE e observaram uma perfeita correlação entre os pulsotipos

apresentados e os sorotipos dos isolados. Boa relação entre sorotipos e pulsotipos obtidos pelo PFGE foi também observada por Mohamed et al. (2014), além de correta correlação com a origem do isolado e o perfil de resistência a antibióticos. Por outro lado, Rivoal et al. (2009) observaram diferenças entre pulsotipos e sorotipos dos isolados estudados, assim como ocorreu no estudo de Torpdahl et al. (2005).

Estudos desta natureza são importantes pois, mostram que a PFGE, por ser uma técnica mais discriminatória, é ideal para comparação de isolados de regiões geograficamente próximas, além de correlação entre contaminação do alimento e suas origens na linha de produção (Torpdahl et al., 2005).

5. Referências

- Ababouch, L., 2000. The role of government agencies in assessing HACCP. *Food Control* 11:137-142.
- ABCZ, 2014. Associação Brasileira dos Criadores de Zebu. Associação Brasileira dos Criadores de Zebu, Uberaba, MG.
- ABIEC, 2011. Perfil da pecuária brasileira. Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carne.
- ABIEC, 2012. Mercado Mundial de Carne Bovina. Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carne.
- Ahmed, A.M. & Shimamoto, T., 2014. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella* spp. from meat and dairy products in Egypt. *International Journal of Food Microbiology* 168-169:57-62.

- Almeida, F., Pitondo-Silva, A., Oliveira, M.A., & Falcão, J.P., 2013. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 19:145-151.
- Altekruse, S.F., Bauer, N., Chanlongbutra, A., DeSagun, R., Naugle, A., Schlosser, W., Umholtz, R., & White, P., 2006. *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens, United States, 2000-2005. *Emerging Infectious Diseases* 12:1848-1852.
- ANVISA, 2001. Resolução RDC 12 - Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos, p. 48p. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, Brasil.
- Arrigoni, M.B., 2001. Produção de novilho precoce, p. 19, Botucatu: FMVZ.
- Arthur, T.M., Bosilevae, J.M., Brichta-Harhay, D.M., Guerini, M.N., Kalchayanand, N., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., & Koohmaraie, M., 2007. Transportation and lairage environment effects on prevalence, numbers and diversity of *Escherichia coli* O157:H7 on hides and carcasses of beef cattle at processing. *Journal of Food Protection* 70.
- Baptista, F., Moreira, E.C., Santos, W.L.M., & Dieguez, B.R., 1999. Peso de carcaça e idade dos bovinos abatidos em Minas Gerais. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 51.
- Barco, L., Barrucci, F., Olsen, J.E., & Ricci, A., 2013. *Salmonella* source attribution based on microbial subtyping. *International Journal of Food Microbiology* 163:193-203.
- Barkocy-Gallagher, G.A., Arthur, T.M., Rivera-Betancourt, M., Nou, X.W., Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., & Koohmaraie, M., 2003. Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157: H7 and non-O157

- serotypes, and *Salmonella* spp in commercial beef processing plants. *Journal of Food Protection* 66:1978-1986.
- Baumler, A.J., Norris, T.L., Lasco, T., Voight, W., Reissbrodt, R., Rabsch, W., & Heffron, F., 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* 180:1446-1453.
- Behlau, I. & Miller, S.I., 1993. PhoP-Repressed Gene Promotes *Salmonella typhimurium* Invasion of Epithelial Cells. *Journal of Bacteriology* 175:4475-4484.
- Borch, E. & Arinder, P., 2002. Bacteriological safety issues in beef and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meta Science* 62:381-390.
- Brasil, 2013a. MAPA - Exportações do agronegócio registram maior valor da história. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF.
- Brasil, 2013b. Projeções do Agronegócio. Brasil 2012/13 a 2022/23 - Projeções de Longo Prazo. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF.
- Buncic, S., Nychas, G.J., Lee, M.R., Koutsoumanis, K., Hebraud, M., Desvaux, M., Chorianopoulos, N., Bolton, D., Blagojevic, B., & Antic, D., 2013. Microbial pathogen control in the beef chain: Recent research advances. *Meat Science*.
- Buncic, S. & Sofos, J., 2012. Interventions to control *Salmonella* contamination during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International* 45:641-655.
- Campioni, F., Moratto Bergamini, A.M., & Falcao, J.P., 2012. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiology* 32:254-264.
- Carramiñana, J.J., Rota, C., Agustín, I., & Herrera, A., 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology* 104:133-139.

- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R.M., 2012. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International* 45:545-556.
- Choi, Y.M., Park, H.J., Jang, H.I., Kim, S.A., Imm, J.Y., Hwang, I.G., & Rhee, M.S., 2013. Changes in microbial contamination levels of porcine carcasses and fresh pork in slaughterhouses, processing lines, retail outlets, and local markets by commercial distribution. *Research in Veterinary Science* 94:413-418.
- Cocolin, L., Rajkovic, A., Rantsiou, K., & Uyttendaele, M., 2011. The challenge of merging food safety diagnostic needs with quantitative PCR platforms. *Trends in Food Science & Technology* 22:S30-S38.
- Cullor, J.S., 1995. Common pathogens that cause foodborne disease: can they be controlled on the dairy. *Veterinary Medicine* 2:185-194.
- D'Silva, J., 2000. Factory farming and developing countries: a compassion in world farming trust briefing, Petersfield: Compassion in World Farming Trust.
- Dong, P., Zhu, L., Mao, Y., Liang, R., Niu, L., Zhang, Y., Li, K., & Luo, X., 2014. Prevalence and profile of *Salmonella* from samples along the production line in Chinese beef processing plants. *Food Control* 38:54-60.
- Eisel, W.G., Linton, R.H., & Muriana, P.M., 1997. A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources, and ground beef in a processing plant. *Food Microbiology* 14:273-282.
- EMBRAPA, 2003. Criação de Bovinos de Corte na Região Sudeste. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.
- EU, 2007. Commission Regulation - Amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs, p. 18. In: EU (ed.), 1441, Official Journal of the European Union.

- FAO, 2009. FAO debate erradicação da fome em conferência sobre direitos humanos das mulheres. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO, 2010. Addressing food insecurity in protracted crises. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Itália.
- Favier, G.I., Lucero Estrada, C.S.M., Lazarte Otero, V., & Escudero, M.E., 2013. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. *Food Control* 29:49-54.
- Foxman, B., Zhang, L., Koopman, J., Manning, S., & Marrs, C., 2005. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations* 2:1-8.
- Gaaloul, I., Riabi, S., & Ghorbel, R.E., 2011. Implementation of ISO 22000 in cereal food industry “SMID” in Tunisia. *Food Control* 22:59-66.
- Galan, J.E. & Curtiss III, R., 1989. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 86:6383-6387.
- Gill, C.O., 1998. Microbiological contamination of meat during slaughter and butchering of cattle, sheep and pigs. *The Microbiology of Meat and Poultry. London: Blackie Academic and Professional*:118-157.
- Gill, C.O., Deslandes, B., Rahn, K., Houde, A., & Bryant, J., 1998. Evaluation of the hygienic performances of the processes for beef carcass dressing at 10 packing plants. *Journal of Applied Microbiology Bedford* 84:1050-1058.
- Gomes-Neves, E., Antunes, P., Tavares, A., Themudo, P., Cardoso, M.F., Gartner, F., Costa, J.M., & Peixe, L., 2012. *Salmonella* cross-contamination in swine

- abattoirs in Portugal: Carcasses, meat and meat handlers. *International Journal of Food Microbiology* 157:82-87.
- Groisman, E.A. & Ochman, H., 1997. How *Salmonella* became a pathogen. *Trends in Microbiology* 5:143-349.
- Haghjoo, E. & Galan., J.E., 2004. *Salmonella typhi* encodes a functional cytolethal distending toxin that is delivered into host cells by a bacterial internalization pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A* 101:4614-4619.
- Haileselassie, M., Taddele, H., Adhana, K., & Kalayou, S., 2013. Food safety knowledge and practices of abattoir and butchery shops and the microbial profile of meat in Mekelle City, Ethiopia. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 3:407-412.
- Hauge, S.J., Nafstad, O., Røtterud, O.-J., & Nesbakken, T., 2012. The hygienic impact of categorisation of cattle by hide cleanliness in the abattoir. *Food Control* 27:100-107.
- Hur, J., Jawale, C., & Lee, J.H., 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. *Food Research International* 45:819-830.
- ICMSF, 2006. Use of epidemiologic data to measure the impact of food safety control programs. *Food Control* 17:825-837.
- Janakiraman, A. & Slauch., J.M., 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 35:1146-1155.
- Kaeppli, R., Kaiser, P., Stecher, B., & Hardt, W.-D., 2011. Roles of *spvB* and *spvC* in *S. Typhimurium* colitis via the alternative pathway. *International Journal of Medical Microbiology* 301:117-124.

- Kotetishvili, M., Stine, O.C., Kreger, A., Morris Jr., J.G., & Sulakvelidze, A., 2002. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 40:1626-1635.
- Lianou, A. & Koutsoumanis, K.P., 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology* 160:171-178.
- Liu, B., Zhang, L., Zhu, X., Shi, C., Chen, J., Liu, W., He, X., & Shi, X., 2011a. PCR identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by comparative genomics. *International Journal of Food Microbiology* 144:511-518.
- Liu, W.B., Liu, B., Zhu, X.N., Yu, S.J., & Shi, X.M., 2011b. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing. *Food Microbiology* 28:1182-1189.
- Luning, P.A., Marcelis, W.J., Rovira, J., Van der Spiegel, M., Uyttendaele, M., & Jacxsens, L., 2009. Systematic assessment of core assurance activities in a company specific food safety management system. *Trends in Food Science & Technology* 20:300-312.
- Mohamed, T., Zhao, S., White, D.G., & Parveen, S., 2014. Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Kentucky isolated from pre- and post-chill whole broilers carcasses. *Food Microbiology* 38:6-15.
- Møretrø, T., Heir, E., Nesse, L.L., Vestby, L.K., & Langsrud, S., 2012. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International* 45:532-544.
- Musa, H.-H., Zhang, W.-J., Lv, J., Duan, X.-L., Yang, Y., Zhu, C.-H., Li, H.-F., Chen, K.-W., Meng, X., & Zhu, G.-Q., 2013. The molecular adjuvant mC3d

- enhances the immunogenicity of FimA from type I fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*:1-6.
- Narvaez-Bravo, C., Rodas-Gonzalez, A., Fuenmayor, Y., Flores-Rondon, C., Carruyo, G., Moreno, M., Perozo-Mena, A., & Hoet, A.E., 2013. *Salmonella* on feces, hides and carcasses in beef slaughter facilities in Venezuela. *International Journal of Food Microbiology* 166:226-230.
- Oliveira, S.D., Flores, F.S., Santos, L.R., & Brandelli, A., 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology* 97:297-305.
- ONU, 2013a. ONU: um terço dos alimentos produzidos no mundo são desperdiçados, enquanto 840 milhões passam fome. ONU.
- ONU, 2013b. População mundial deve atingir 9,6 bilhões em 2050, diz novo relatório da ONU. ONU.
- Osés, S.M., Luning, P.A., Jacxsens, L., Santillana, S., Jaime, I., & Rovira, J., 2012. Food safety management system performance in the lamb chain. *Food Control* 25:493-500.
- Papadopoulou, O.S., Chorianopoulos, N.G., Gkana, E.N., Grounta, A.V., Koutsoumanis, K.P., & Nychas, G.J., 2012. Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. *Meat Science* 90:865-869.
- Park, S.H., Aydin, M., Khatiwara, A., Dolan, M.C., Gilmore, D.F., Bouldin, J.L., Ahn, S., & Ricke, S.C., 2014. Current and emerging technologies for rapid

- detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiology* 38:250-262.
- Paul A. Gulig, Hirofumi Danbara, Donald G. Guiney, Alistair J. Lax, Norel, F., & Rhen, M., 1993. Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Molecular Microbiology* 7:825-830.
- Perez-Losada, M., Cabezas, P., Castro-Nallar, E., & Crandall, K.A., 2013. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infection Genetics and Evolution* 16:38-53.
- Rasschaert, G., Houf, K., & De Zutter, L., 2007. Impact of the slaughter line contamination on the presence of *Salmonella* on broiler carcasses. *Journal of Applied Microbiology* 103:333-341.
- Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S.D., Arthur, T.M., Westmoreland, K.E., Bellinger, G., Rossman, M., Reagan, J.O., & Koohmaraie, M., 2004. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. *Journal of Food Protection* 67:295-302.
- Rivoal, K., Protais, J., Quéguiner, S., Boscher, E., Chidaine, B., Rose, V., Gautier, M., Baron, F., Grosset, N., Ermel, G., & Salvat, G., 2009. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology* 129:180-186.
- Roblin, P., Lebrun, P., Rucktooa, P., Dewitte, F., Lens, Z., Receveur-Brechot, V., Raussens, V., Villeret, V., & Bompard, C., 2013. The structural organization of the N-terminus domain of SopB, a virulence factor of *Salmonella*, depends on the

- nature of its protein partners. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* 1834:2564-2572.
- Ruby, J.R., Zhu, J., & Ingham, S.C., 2007. Using indicator bacteria and *Salmonella* spp test results from three large-scale beef abattoirs over an 18-month period to evaluate intervention system efficacy and plan carcass testing for *Salmonella* spp. *Journal of Food Protection* 70:2732-2740.
- Schwaiger, K., Huther, S., Holzel, C., Kampf, P., & Bauer, J., 2012. Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *International Journal of Food Microbiology* 154:206-211.
- Serraino, A., Bardasi, L., Riu, R., Pizzamiglio, V., Liuzzo, G., Galletti, G., Giacometti, F., & Meriardi, G., 2012. Visual evaluation of cattle cleanliness and correlation to carcass microbial contamination during slaughtering. *Meat Science* 90:502-506.
- Skyberg, J.A., Logue, C.M., & Nolan, L.K., 2006. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases* 50:77-81.
- Stevens, A., Kabore, Y., Perrier-Gros-Claude, J.D., Millemann, Y., Brisabois, A., Catteau, M., Cavin, J.F., & Dufour, B., 2006. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from beef sampled from the slaughterhouse and from retailers in Dakar (Senegal). *International Journal of Food Microbiology* 110:178-186.
- Tankouo-Sandjong, B., Sessitsch, A., Liebana, E., Kornschober, C., Allerberger, F., Hachler, H., & Bodrossy, L., 2007. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars. *Journal of Microbiological Methods* 69:23-36.

- Torpdahl, M., Skov, M.N., Sandvang, D., & Baggesen, D.L., 2005. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. *Journal of Microbiological Methods* 63:173-184.
- Turki, Y., Ouzari, H., Mehri, I., Ben Aissa, R., & Hassen, A., 2012. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. *Food Research International* 45:940-946.
- Van, T.T., Nguyen, H.N., Smooker, P.M., & Coloe, P.J., 2012. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *International Journal of Food Microbiology* 154:98-106.
- Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A., Skoufos, I., & Bezirtzoglou, E., 2011. Hygienic quality and antibiotic resistance profile of sliced butchery. *Anaerobe* 17:344-350.
- Wang, H.-H., Ye, K.-P., Zhang, Q.-Q., Dong, Y., Xu, X.-L., & Zhou, G.-H., 2013a. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. *Food Control* 32:650-658.
- Wang, H., Ye, K., Wei, X., Cao, J., Xu, X., & Zhou, G., 2013b. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. *Food Control* 33:378-384.
- Wong, J.W. & Selvam, A., 2009. Reduction of indicator and pathogenic microorganisms in pig manure through fly ash and lime addition during alkaline stabilization. *Journal of Hazardous Materials* 169:882-889.

OBJETIVOS

Objetivo geral

A presente pesquisa teve como objetivo geral a detecção das origens e rotas de contaminação por *Salmonella* spp. em carne bovina, através da pesquisa e caracterização desse patógeno em pontos críticos de contaminação da linha de processamento em frigoríficos e açougues.

Objetivos específicos

Os objetivos específicos da pesquisa foram:

- ✓ Identificar os pontos críticos de contaminação por *Salmonella* spp. em carcaças bovinas, ambientes de matadouros-frigoríficos e açougues;
- ✓ Identificar genes relacionados a patogenicidade dos isolados obtidos;
- ✓ Caracterizar o perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados;
- ✓ Caracterizar os perfis genéticos dos isolados por PFGE;
- ✓ Analisar os resultados para caracterização das origens e rotas de contaminação em cadeias de processamento de carne bovina.

CAPÍTULO 1. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas

Gerais state, Brazil: from bovine hides to end cuts

Artigo preparado com dados da tese desenvolvida.

Publicado no periódico Food Control

Cossi MVC, Burin RCK, Camargo AC, Dias MR, Lanna FGPA, Pinto PSA, Nero LA. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: From bovine hides to end cuts. Food Control, v. 40, p. 320-323, 2014.

doi: 10.1016/j.foodcont.2013.12.018

1 Title page
2
3 Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state,
4 Brazil: from bovine hides to end cuts
5
6 Running title: *Salmonella* in beef processing
7
8 Marcus Vinícius Coutinho Cossi, Raquel Cristina Konrad Burin, Anderson Carlos
9 Camargo, Mariane Rezende Dias, Frederico Germano Piscitelli Alvarenga Lanna,
10 Paulo Sérgio de Arruda Pinto, Luís Augusto Nero*
11
12 Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36570 000, Viçosa,
13 MG, Brazil
14
15 * Corresponding author: Tel.: + 55 31 3899 1463; fax: + 55 31 3899 1457. E-mail
16 address: nero@ufv.br (L.A. Nero)

17 Abstract

18 The present study aimed to track possible contamination sources of *Salmonella* spp.
19 during bovine slaughtering. Three slaughterhouses located in Minas Gerais state,
20 Brazil were selected and 836 samples were obtained by surface swabbing of 209
21 bovine carcasses at four steps of slaughtering: I) after bleeding (from the hide), II)
22 after skinning, III) after evisceration, and IV) after end washing (performed with cold
23 water). Samples were subjected to *Salmonella* spp. detection according to ISO 6975,
24 and the suspected isolates were identified by PCR as *Salmonella* by targeting the
25 *ompC* gene and performing serotyping. Twenty isolates were confirmed as
26 *Salmonella* and subjected to *XbaI* macrorestriction and pulsed-field gel
27 electrophoresis (PFGE). *Salmonella* spp. was detected in the hides of six animals,
28 during slaughtering after skinning (one carcass), after evisceration (two carcasses),
29 and after end washing (three carcasses). Isolates were serotyped as *S. Dublin* (n = 7),
30 *S. Derby* (n = 8), *S. Infantis* (n = 1), *S. Give* (n = 1), and *S. enterica* subsp. *salamae*
31 (n = 3). PFGE demonstrated identical *Salmonella* pulse-types from hides and
32 slaughtering steps of skinning and evisceration, as well as from animal hides
33 obtained from distinct slaughterhouses. The obtained data indicate a low prevalence
34 of *Salmonella* spp. during bovine slaughtering in selected industries from Minas
35 Gerais state, Brazil, but identified possible routes of contamination of pathogenic
36 serotypes.

37 Keywords: *Salmonella*; bovine; slaughtering; PFGE

38 1. Introduction

39

40 *Salmonella* spp. is an important foodborne pathogen associated with products of
41 animal origin, such as beef, pork, and poultry (Abbassi-Ghozzi et al., 2012; Dallal et
42 al., 2010; Stevens et al., 2008). This usual association with such products is a result
43 of the autochthonous presence of *Salmonella* in the intestinal microbiota of farm
44 animals, which facilitates the contamination of carcasses during slaughtering, mainly
45 due to improper handling and processing (Abbassi-Ghozzi et al., 2012; Buncic &
46 Sofos, 2012).

47 Several steps of animal slaughtering and meat processing are considered key points
48 for *Salmonella* contamination, requiring constant monitoring and control. In the
49 context of contamination control in food industries based on Hazard Analysis and
50 Critical Control Points (HACCP), such key points include hide removal (skinning),
51 evisceration, washing before freezing, handling of cuts and meat products, and cross-
52 contamination at several steps between utensils, equipment, and food products
53 (Buncic & Sofos, 2012; Gill et al., 2003; Pointon et al., 2012).

54 Considering the potential hazard of *Salmonella* for humans, its contamination
55 during beef processing must be monitored by reliable and proper methodologies, in
56 order to allow the identification of the exact points of contamination by most
57 pathogenic serotypes. With this purpose, associating conventional isolation
58 procedures with molecular methodologies is undoubtedly required to obtain valuable
59 results to properly track the specific origins of *Salmonella* spp. (Amini et al., 2010;
60 Skyberg et al., 2006). Based on the relevance of *Salmonella* spp. in the beef
61 processing chain, the present study aimed to identify the origins of contamination of
62 this foodborne pathogen in distinct points of slaughtering of three slaughterhouses,

63 and also in the processing environment in one of them, located in Minas Gerais state,
64 Brazil, using conventional and molecular methodologies.

65 2. Materials and Methods

66

67 2.1. Slaughterhouses and sampling

68 Three slaughterhouses located in Minas Gerais State, Brazil were included in the
69 present study after agreement by the owners and the identification of regular bovine
70 slaughtering in their facilities. All selected facilities were representative of
71 slaughterhouses located in Minas Gerais state, Brazil, regarding slaughtering
72 frequency, utensils and equipment employed, and all of them have Hazard Analysis
73 and Critical Control Points (HACCP) programs, and their key characteristics are
74 described in the following:

75 Slaughterhouse 01 (Sl01): daily slaughtering of 130 to 150 bovines, conducted by
76 approximately 50 employees, and absence of physical division between dirty and
77 clean areas. Sl01 is allowed to export a diversity of beef products, which are also
78 distributed for sale in Brazilian market.

79 Slaughterhouse 02 (Sl02): bovine slaughtering occurs two or three times a week,
80 with 90 to 100 bovines being processed by approximately 25 employees, and absence
81 of physical division between dirty and clean areas. Sl02 is not allowed to export any
82 beef product, being its production destined exclusively to Brazilian market.

83 Slaughterhouse 03 (Sl03): daily slaughtering of 150 to 180 bovines, conducted by
84 approximately 50 employees, and absence of physical division between dirty and
85 clean areas. Sl03 exports only viscera, and beef cuts are distributed for sale in
86 distinct Brazilian states.

87 Each slaughterhouse was visited 10 times in a two-year period, with a total of 836

88 samples obtained by surface swabbing of 209 bovine carcasses (SI01: 69, SI02: 70;
89 SI03: 70) at four steps of slaughtering: I) after bleeding (from the hide), II) after
90 skinning, III) after evisceration, and IV) after end washing (performed with cold
91 water). Surface sampling was conducted by swabbing four sterile sponges (3M
92 Microbiology, St. Paul, MN, USA), each previously moistened with 10 mL of
93 buffered peptone (1% w/v) saline (0.85% w/v) solution (BPS, Oxoid Ltd.,
94 Basingstoke, England), in four 100 cm² delimited areas of the shoulder and chest (I
95 and II, only the outer surface of the whole carcass; III and IV, the outer and inner
96 surface of both half-carcasses). After sampling, swabs were placed in sterile bags and
97 kept at 4°C until microbiological analysis.

98 Surface samples of tables (n = 39), knives (n = 13), and employees' hands (n = 37)
99 were also obtained in the beef processing environment of SI01, using the same
100 procedure described previously. These samples were obtained before the start of beef
101 processing activities, as well as during beef processing and handling. Finally, beef
102 cuts obtained at the end of beef processing in SI01 were sampled by surface
103 swabbing, as described previously: shoulder (n = 32), rump (n = 32), and tenderloin
104 (n = 30).

105

106 2.2. *Salmonella* detection

107 Samples were subjected to *Salmonella* detection according to ISO 6975 (ISO, 2002),
108 with some modifications. Under sterile conditions, each sample set (four sponges)
109 was treated with 160 mL of BPS (Oxoid) and homogenised at 4°C and 260 rpm
110 (Stomacher 400 circulator, Seward, Worthing, England). Then, 40 mL of the
111 obtained homogenates were centrifuged at 1,000 × g for 15 min, the supernatant was
112 discarded, and the obtained pellet was re-suspended in 10 mL of buffered peptone

113 water at 1% (w/v) (Oxoid); this was followed by incubation at 37°C for 18 h. Then,
114 the obtained cultures were transferred to Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin
115 broth and Rappaport-Vassiliadis medium with soya (both from Oxoid), which were
116 incubated at 37°C for 24 h and 42°C for 24 h, respectively. The obtained cultures
117 were streaked onto plates containing xylose lysine deoxycholate agar and mannitol
118 lysine crystal violet brilliant green agar (both from Oxoid) and incubated at 37°C for
119 24 h. *Salmonella* suspect colonies were transferred to triple sugar iron agar and
120 lysine iron agar slants (both from Oxoid), and incubated at 37°C for 24 h.

121 Cultures that presented typical or suspect reactions were subjected to
122 serotyping at Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). To
123 confirm the genus identification, cultures of the suspect colonies were subjected to
124 DNA extraction using the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega Corp.,
125 Madison, WI, USA) and subjected to PCR reaction as described by Alvarez et al.
126 (2004) in order to detect the *ompC* gene (typical for *Salmonella* spp.).

127

128 2.3. *Salmonella* fingerprinting

129 Isolates identified by serotyping and PCR as *Salmonella* spp. were subjected to DNA
130 macrorestriction with *Xba*I and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for
131 fingerprinting, as indicated by the PulseNet (Centers for Disease Control and
132 Prevention, Atlanta, GA, USA) and following the protocol described by Ribot et al.
133 (2006). Briefly, plugs of the isolates were digested with 50 U of *Xba*I (Promega) at
134 37°C for 2 h and the macrorestriction products were separated on agarose gels at 1%
135 (w/v) by PFGE, using TBE 0.5 × at 4°C in CHEF-DR II (Bio-Rad Lab., Hercules,
136 CA, USA) with the following parameters: initial switch of 2.2 s, final switch time of
137 63.8 s, angle of 120°, 6 V/cm, and run time of 19 h. The obtained gels were stained

138 using GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), and the obtained fingerprints were
139 visualised and recorded for analysis.

140

141 2.4. Data analysis

142 The frequencies of positive results for *Salmonella* sp. of bovine carcasses during the
143 slaughtering process in the three slaughterhouses were obtained and compared by the
144 Chi-square test ($p < 0.05$), using the software XLStat 2010.2.03 (AddinSoft, New
145 York, NY, USA). The fingerprints obtained by PFGE were analysed using
146 BioNumerics 6.6 (Applied Maths, Gand, Belgium) with the following parameters:
147 optimisation of 1%; Dice similarity of bands of 5%. Clustering of the fingerprints
148 was obtained by the Unweighted Pair Group Method using Averages (UPGMA).

149

150 3. Results and Discussion

151

152 *Salmonella* spp. were detected in the hides of six animals, and during slaughtering
153 after skinning (one carcass), after evisceration (two carcasses), and after end washing
154 (three carcasses). The distribution of positive results by sampled step of slaughtering
155 and slaughterhouse is presented in Table 1. It can be seen that only in SI01 were
156 significant differences between the frequencies of positive results observed when
157 comparing hide contamination with the slaughtering steps ($p < 0.05$); however, the
158 low frequencies of positive results jeopardised a proper comparison between the
159 studied steps. However, comparing the frequencies of contamination in SI02 and
160 SI03, and also all compiled data, no significant differences were observed between
161 the assessed slaughtering steps ($p > 0.05$).

162 The low occurrence of *Salmonella* spp. in bovine carcasses during

163 slaughtering has already been observed in similar studies conducted in other
164 countries (Li et al., 2004; Madden et al., 2001; Rhoades et al., 2009). Sofos et al.
165 (1999) and Ruby et al. (2007) highlighted the relevance of bovine hide as a reservoir
166 of *Salmonella* spp. for slaughterhouses, as observed in the present study for SI01
167 (Table 1). Also, the contamination of bovine carcasses after the end of the
168 slaughtering process (after the end washing) could be a relevant source of the initial
169 contamination of *Salmonella* spp. in the beef processing environment of
170 slaughterhouses (Barkocy-Gallagher et al., 2003; Rivera-Betancourt et al., 2004;
171 Ruby et al., 2007), as observed in SI03 in the present study (Table 1). However, due
172 to the absence of beef processing in SI03, it was not possible to verify the impact of
173 *Salmonella* spp. contamination of the carcasses after final washing of the end beef
174 products.

175 None of the samples tested from the beef processing environment of SI01
176 presented a positive result for *Salmonella* spp., and neither did the tested beef cuts.
177 Also, none of the bovine carcasses from SI01 were positive for *Salmonella* spp. after
178 the final washing, the last step of the slaughtering process (Table 1). These results
179 suggest the poor relevance of bovine carcasses as possible sources of contamination
180 by *Salmonella* spp. in the beef processing environment, an unexpected result
181 considering the data obtained in previous studies (Bosilevac et al., 2007; Ghafir et
182 al., 2005; Wong et al., 2007). In addition, these results suggest that the hygienic
183 procedures conducted during bovine slaughtering were enough to avoid the
184 contamination by *Salmonella* spp. in the processing environment.

185 Twenty isolates obtained from positive samples were identified as *Salmonella*
186 spp. by serotyping and PCR (targeting *ompC* gene). These isolates were named S01
187 to S20; Figure 1 shows their *Xba*I macrorestriction profiles, as well as their genetic

relationship obtained by clustering, their origins (slaughtering step, bovine, and slaughterhouse), and their identified serotypes. The isolates were grouped into 10 pulse-types, presenting genetic similarity varying from 65 to 100%. It could be seen that isolates that presented identical genetic profiles were present in distinct slaughtering steps from SI02, indicating a route of contamination by this specific *Salmonella* strain in bovine hides (S05 and S06), after skinning (S07), and after evisceration (S09) (Figure 1). In addition, this specific *Salmonella* strain was detected in carcasses from distinct animals (Figure 1), highlighting the relevance of cross-contamination of this foodborne pathogen during slaughtering (Stevens et al., 2008). Despite not including beef processing procedures, the presence of positive results for *Salmonella* spp. in the final carcasses from SI03 must be considered a key contamination point for end-products, as already demonstrated by PFGE in previous studies (Stevens et al., 2008; Yang et al., 2013; Yang et al., 2010).

The genetic profiles of the isolates also allowed the identification of common sources of contamination for distinct slaughterhouses. S03 and S04 were isolated from SI01, and S05, S06, S07 and S09 were isolated from SI02; all these isolates presented identical *Xba*I macrorestriction patterns (Figure 1). The identification of common sources of contamination by *Salmonella* in the beef processing chain, as identified in the present study, highlights the necessity of proper control from the initial steps of production onwards (Stevens et al., 2008).

The isolates were serotyped as *S. Dublin* (n = 7), *S. Derby* (n = 8), *S. Infantis* (n = 1), *S. Give* (n = 1), and *S. enterica* subsp. *salamae* (n = 3) (Figure 1). *S. Dublin* is commonly associated with bovines, but rarely associated with salmonellosis cases and outbreaks, despite being known for its high potential for intestinal mucosa invasion (Davis et al., 2007; Littrup et al., 2010). The presence of this serotype in

213 hides (n = 4) indicates faecal contamination on the animals, and transfer to bovine
214 carcasses after skinning (n = 1) (Figure 1). In addition, one *S. Dublin* isolate was
215 detected in a bovine carcass after evisceration, indicating failures in this step during
216 slaughtering (Figure 1).

217 *S. Derby* is usually associated with swine slaughtering and pork processing,
218 and the few infections caused by this serotype are caused by the ingestion of
219 contaminated foods (Litrup et al., 2010; Michael et al., 2006). The occurrence of this
220 serotype in bovine carcasses may also have been a result of inadequate cleaning
221 procedures in SI02 and SI03, as these facilities also conduct swine slaughtering,
222 usually in the period before bovine slaughtering.

223 *S. Infantis*, *S. Give* and *S. enterica* subsp. *salamae* were also identified, but at low
224 frequencies. *S. Infantis* is often isolated from animals and their foods, and is
225 considered a relevant pathogenic agent for humans that is usually associated with
226 foodborne diseases (Rivoal et al., 2009; Shahada et al., 2006). Despite *S. Give*
227 usually being associated with bovine and swine, this serotype is not a common cause
228 of salmonellosis cases and outbreaks (Girardin et al., 2006).

229 Despite the low frequencies of positive results observed for *Salmonella* spp.
230 during bovine slaughtering and beef processing, the obtained data allowed the
231 identification of cross-contamination of this foodborne pathogen between key steps
232 of the slaughtering process from the selected slaughterhouses in Minas Gerais state,
233 Brazil. These data also demonstrate the presence of pathogenic serotypes at such
234 points, highlighting the significance of the proper control of contamination during
235 bovine slaughtering.

236

237 Acknowledgements

238 The authors are thankful to CNPq, CAPES, and FAPEMIG.

239

240 References

241

242 Abbassi-Ghozzi, I., Jaouani, A., Hammami, S., Martinez-Urtaza, J., Boudabous, A.,
243 & Gtari, M., 2012. Molecular analysis and antimicrobial resistance of *Salmonella*
244 isolates recovered from raw meat marketed in the area of “Grand Tunis”, Tunisia.
245 *Pathologie Biologie* 60:e49-e54.

246 Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A.B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., &
247 Garaizar, J., 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and
248 epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal of*
249 *Clinical Microbiology* 42:1734-1738.

250 Amini, K., Salehi, T.Z., Nikbakht, G., Ranjbar, R., Amini, J., & Ashrafganjooei,
251 S.B., 2010. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella*
252 Enteritidis isolated from human and animals in Iran. *African Journal of*
253 *Microbiology Research* 4:2202-2210.

254 Barkocy-Gallagher, G.A., Arthur, T.M., Rivera-Betancourt, M., Nou, X.W.,
255 Shackelford, S.D., Wheeler, T.L., & Koohmaraie, M., 2003. Seasonal prevalence
256 of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157: H7 and non-O157
257 serotypes, and *Salmonella* spp in commercial beef processing plants. *Journal of*
258 *Food Protection* 66:1978-1986.

259 Bosilevac, J.M., Guerini, M.N., Brichta-Harhay, D.M., Arthur, T.M., & Koohmaraie,
260 M., 2007. Microbiological characterization of imported and domestic boneless
261 beef trim used for ground beef. *Journal of Food Protection* 70:440-449.

262 Buncic, S. & Sofos, J., 2012. Interventions to control *Salmonella* contamination
 263 during poultry, cattle and pig slaughter. *Food Research International* 45:641-655.

264 Dallal, M.M.S., Doyle, M.P., Rezadehbashi, M., Dabiri, H., Sanaei, M., Modarresi,
 265 S., Bakhtiari, R., Sharifiy, K., Taremi, M., Zali, M.R., & Sharifi-Yazdi, M.K.,
 266 2010. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes,
 267 *Campylobacter* and *Yersinia* spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran,
 268 Iran. *Food Control* 21:388-392.

269 Davis, M.A., Hancock, D.D., Besser, T.E., Daniels, J.B., Baker, K.N.K., & Call,
 270 D.R., 2007. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Dublin
 271 isolates from beef and dairy sources. *Veterinary Microbiology* 119:221-230.

272 Ghafir, Y., China, B., Korsak, N., Dierick, K., Collard, J.M., Godard, C., De Zutter,
 273 L., & Daube, G., 2005. Belgian surveillance plans to assess changes in *Salmonella*
 274 prevalence in meat at different production stages. *Journal of Food Protection*
 275 68:2269-2277.

276 Gill, C.O., Bryant, J., & Landers, C., 2003. Identification of critical control points for
 277 control of microbiological contamination in processes leading to the production of
 278 ground beef at a packing plant. *Food Microbiology* 20:641-650.

279 Girardin, F., Mezger, N., Hachler, H., & Bovier, P.A., 2006. *Salmonella* serovar
 280 Give: an unusual pathogen causing splenic abscess. *European Journal of Clinical*
 281 *Microbiology & Infectious Diseases* 25:272-274.

282 ISO, 2002. ISO 6579 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal
 283 method for the detection of *Salmonella* spp., p. 27. International Organization for
 284 Standardization, Geneva, Switzerland.

285 Li, Q.Z., Sherwood, J.S., & Logue, C.M., 2004. The prevalence of *Listeria*,
 286 *Salmonella*, *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7 on bison carcasses during
 287 processing. *Food Microbiology* 21:791-799.

288 Litrup, E., Torpdahl, M., Malorny, B., Huehn, S., Christensen, H., & Nielsen, E.M.,
 289 2010. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of
 290 *Salmonella enterica*. *Infection Genetics and Evolution* 10:1132-1139.

291 Madden, R.H., Espie, W.E., Moran, L., McBride, J., & Scates, P., 2001. Occurrence
 292 of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and
 293 *Campylobacter* spp. on beef carcasses in Northern Ireland. *Meat Science* 58:343-
 294 346.

295 Michael, G.B., Cardoso, M., Rabsch, W., & Schwarz, S., 2006. Phenotypic and
 296 genotypic differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar
 297 Derby isolates. *Veterinary Microbiology* 118:312-318.

298 Pointon, A., Kiermeier, A., & Fegan, N., 2012. Review of the impact of pre-slaughter
 299 feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and carcase hygiene in
 300 Australia. *Food Control* 26:313-321.

301 Rhoades, J.R., Duffy, G., & Koutsoumanis, K., 2009. Prevalence and concentration
 302 of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria*
 303 *monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiology*
 304 26:357-376.

305 Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan,
 306 B., & Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis
 307 protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157 : H7 *Salmonella*, and
 308 *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* 3:59-67.

309 Rivera-Betancourt, M., Shackelford, S.D., Arthur, T.M., Westmoreland, K.E.,
 310 Bellinger, G., Rossman, M., Reagan, J.O., & Koohmaraie, M., 2004. Prevalence
 311 of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp in two
 312 geographically distant commercial beef processing plants in the United States.
 313 *Journal of Food Protection* 67:295-302.

314 Rivoal, K., Protais, J., Quéguiner, S., Boscher, E., Chidaine, B., Rose, V., Gautier,
 315 M., Baron, F., Grosset, N., Ermel, G., & Salvat, G., 2009. Use of pulsed-field gel
 316 electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella*
 317 serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole
 318 liquid eggs. *International Journal of Food Microbiology* 129:180-186.

319 Ruby, J.R., Zhu, J., & Ingham, S.C., 2007. Using indicator bacteria and *Salmonella*
 320 spp test results from three large-scale beef abattoirs over an 18-month period to
 321 evaluate intervention system efficacy and plan carcass testing for *Salmonella* spp.
 322 *Journal of Food Protection* 70:2732-2740.

323 Shahada, F., Chuma, T., Tobata, T., Okamoto, K., Sueyoshi, M., & Takase, K., 2006.
 324 Molecular epidemiology of antimicrobial resistance among *Salmonella enterica*
 325 serovar Infantis from poultry in Kagoshima, Japan. *International Journal of*
 326 *Antimicrobial Agents* 28:302-307.

327 Skyberg, J.A., Logue, C.M., & Nolan, L.K., 2006. Virulence genotyping of
 328 *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases* 50:77-81.

329 Sofos, J.N., Kochevar, S.L., Reagan, J.O., & Smith, G.C., 1999. Incidence of
 330 *Salmonella* on beef carcasses relating to the US meat and poultry inspection
 331 regulations. *Journal of Food Protection* 62:467-473.

332 Stevens, A., Kerouanton, A., Marault, M., Millemann, Y., Brisabois, A., Cavin, J.-F.,
 333 & Dufour, B., 2008. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef

334 sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field
 335 gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *International Journal of*
 336 *Food Microbiology* 123:191-197.

337 Wong, T.L., Nicol, C., Cook, R., & MacDiarmid, S., 2007. *Salmonella* in uncooked
 338 retail meats in New Zealand. *Journal of Food Protection* 70:1360-1365.

339 Yang, B., Qiao, L., Zhang, X., Cui, Y., Xia, X., Cui, S., Wang, X., Meng, X., Ge,
 340 W., Shi, X., Wang, D., & Meng, J., 2013. Serotyping, antimicrobial susceptibility,
 341 pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in
 342 Henan Province, China. *Food Control* 32:228-235.

343 Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., Xi, M., Sheng, M., Zhi, S., &
 344 Meng, J., 2010. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail
 345 meats of marketplace in Shaanxi, China. *International Journal of Food*
 346 *Microbiology* 141:63-72.

347
 348

Table 1. Frequencies of positive results for *Salmonella* spp. obtained from 209 bovine carcasses at four steps of slaughtering (I: from hide; II: after skinning; III: after evisceration; IV: after end washing) from three slaughterhouses (Sl01, Sl02, Sl03) located in Minas Gerais state, Brazil.

step	slaughterhouse			all
	Sl01	Sl02	Sl03	
I	4/69	1/70	1/70	6/209
II	0/69	1/70	0/70	1/209
III	0/69	2/70	0/70	2/209
IV	0/69	0/70	3/70	3/209
Chi-square	$\chi^2 = 12.176$, p = 0.007	$\chi^2 = 2.029$, p = 0.566	$\chi^2 = 6.087$, p = 0.107	$\chi^2 = 4.735$, p = 0.192

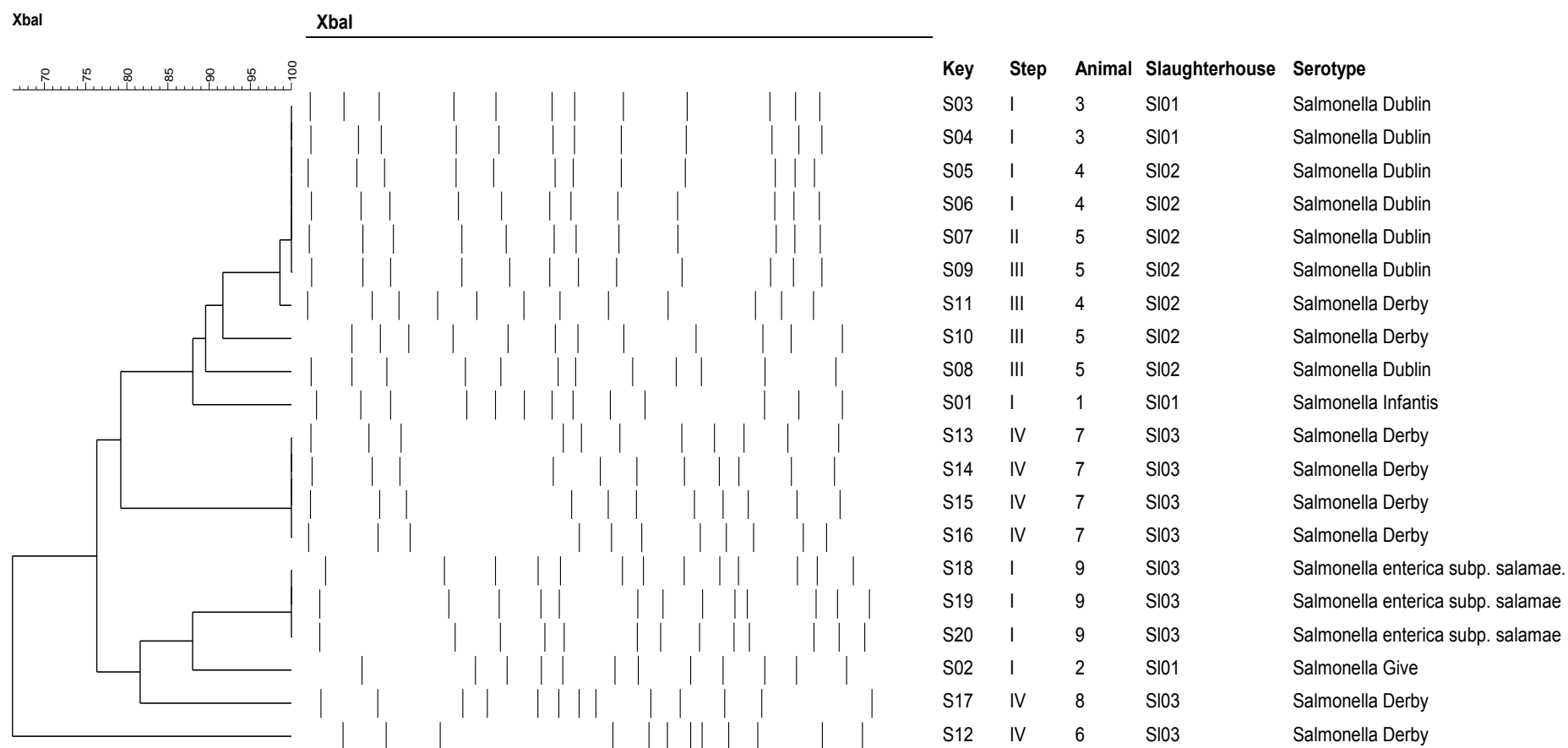


Figure 1. Schematic representation of the obtained PFGE pulsetypes after DNA macrorestriction (*Xba*I) of 20 *Salmonella* spp. isolates obtained at four steps of slaughtering (I: from hide; II: after skinning; III: after evisceration; IV: after end washing) from three slaughterhouses (SI01, SI02, SI03) located in Minas Gerais state, Brazil. Also, identification of their serotypes. Similarities between the identified PFGE pulsetypes were estimated using the Dice coefficient (5% tolerance).

**CAPÍTULO 2. Antimicrobial Resistance and Virulence Profiles of *Salmonella* Isolated
from Butcher Shops in Minas Gerais, Brazil**

Artigo preparado com dados da tese desenvolvida.

Publicado no periódico Journal of Food Protection

Cossi MVC, Burin RCK, Lopes DA, Dias MR, Castilho NPA, Pinto PSA, Nero LA.
Antimicrobial resistance and virulence profiles of *Salmonella* isolated from butcher
shops in Minas Gerais, Brazil. Journal of Food Protection, v. 76, n.9, p. 1633-1637,
2013.

doi:10.4315/0362-028X.JFP-13-119

1 Title page

2

3 Running title: *Salmonella* in butcher shops utensils

4

5 **Antimicrobial Resistance and Virulence Profiles of *Salmonella* Isolated from**
6 **Butcher Shops in Minas Gerais, Brazil**

7

8 **Marcus Vinícius Coutinho Cossi, Raquel Cristina Konrad Burin, Danilo**

9 **Augusto Lopes, Mariane Rezende Dias, Natalia Parma, Paulo Sérgio de Arruda**

10 **Pinto, Luís Augusto Nero***

11

12 Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Campus

13 Universitário, 36570-000, Viçosa, MG, Brazil.

14

15

16

17

18

19

20

21 Keywords: *Salmonella*; butcher shop; utensils; resistance

22

23 * Author for correspondence. Tel.: + 55 xx 31 3899 1463, Fax: + 55 xx 31 3899

24 1457

25 E-mail: nero@ufv.br

26 **ABSTRACT**

27 *Salmonella* spp. can contaminate finished products of butcher shops, mainly due to
28 cross contamination of utensils exposed to raw materials. Aiming to identify the
29 main sources of contamination of this foodborne pathogen in four butcher shop
30 environments, surface samples of employees hands, cutting boards, knives, floor of
31 the refrigeration room, meat grinders, and meat tenderizers were obtained (32
32 samples per point) and subjected to *Salmonella* spp. detection by ISO 6579, with
33 modifications. Suspect isolates were identified by PCR (targeting *ompC*), and
34 confirmed *Salmonella* isolates were subjected to PFGE (using *XbaI*), detection of
35 virulence genes (*invA*, *sefA*, and *spvC*), and screened for resistance to 12 distinct
36 antimicrobials. *Salmonella* spp. was identified only in cutting boards (5 samples),
37 from 3 distinct butcher shops. Fifteen isolates were confirmed as *Salmonella* spp.,
38 being grouped in 4 pulse types (similarity varying from 71.1 to 100%). *invA* was
39 detected in 13 isolates, *sefA* in eight isolates, and no isolate presented *spvC*. All
40 tested isolates presented resistance to clindamycin and sensitivity to amikacin and
41 cefotaxime; all isolates presented resistance to at least 3 antimicrobials. The obtained
42 results indicated the relevance of cutting boards as a contamination source of
43 *Salmonella* spp. in butcher shops, and the occurrence of multidrug resistant strains
44 possessing virulence genes highlights their risks for consumers.

45

46 Keywords: antimicrobial resistance; environmental testing; cutting boards;

47 *Salmonella*

48

INTRODUCTION

Salmonella spp. is considered an important foodborne pathogen worldwide, being the causative agent of salmonellosis and implicated in innumerable cases and outbreaks associated with the consumption of contaminated foods, including meat products (Rhoades et al., 2009; Stevens et al., 2008). This persistent occurrence of *Salmonella* spp. in foods highlights its relevance as a Public Health concern, and also demands proper control by food industries and selling establishments (Carrasco et al., 2012). Considering meat processing arena, *Salmonella* spp. can contaminate finished products mainly by improper handling and cross contamination by raw materials (Little et al., 2008). This scenario is particularly relevant in butcher shop environments, where raw cuts of meat from distinct origins (beef, poultry, pork) are handled by different employees using various equipment and utensils (knives, tenderizers, grinders, slicers) on distinct food contact surfaces (Voidarou et al., 2011). Once present in one such step, *Salmonella* spp. can easily contaminate the end products and become a potential hazard for consumers (Iroha et al., 2011). Despite the known virulence potential of *Salmonella* spp., several studies have demonstrated another relevant concern related to this foodborne pathogen: its resistance to antimicrobials (Oliveira et al., 2005; Zhao et al., 2003). The abusive use of antimicrobials in the feeding and treatment of meat producing animals is considered the main cause of such resistance development by *Salmonella* spp. (Hur et al., 2012), resulting in difficulties in effectively treating humans involved in cases and outbreaks of salmonellosis caused by such strains (Oliveira et al., 2005). Considering the relevance of *Salmonella* spp. as a microbiological hazard associated with meat products, the present study aimed to identify the occurrence and the main

74 points of contamination of this foodborne pathogen in butcher shop environments,
75 and to also identify the pathogenic characteristics and antimicrobial resistance
76 patterns of the obtained isolates.

77

78 MATERIAL AND METHODS

79

80 **Butcher shop selection and sampling.** Four butcher shops located in Viçosa, Minas
81 Gerais state, Brazil, were included in the present study considering the criteria of
82 concordance of the owners, and inspection by official fiscalization services. All
83 selected butcher shops process raw meat from distinct animal origins, and produce a
84 little variety of meat products (mainly fresh sausages), and destine the production
85 directly to consumers. Each butcher shop was visited eight times at two-week
86 intervals during their usual activities, when 32 surface samples were obtained from
87 each of the following points: employees hands, cutting boards (plastic), knives, floor
88 of the refrigeration room, meat grinders, and meat tenderizers. Samples were
89 obtained during the usual processing and handling of meat products in each butcher
90 shop, without specific cleaning procedures. Selected points were sampled by surface
91 swabbing of two areas of 50 cm² (a limited area with a sterile template of 5 x 10 cm),
92 using two sterile sponges (3M Microbiology, St. Paul, MN, USA) previously
93 moistened with 10 mL of buffered peptone (0.1% w/v) saline (0.85% w/v) solution
94 (BPS, Oxoid Ltd., Basingstoke, England), and kept under refrigeration up to 60 min
95 until analysis. Specifically for hands swabbing, the palm and fingers were swabbed
96 due to the direct contact with meat products. Then, each set of two sponges per
97 sample were transferred to a sterile bag and added to 80 mL of PBS (total volume
98 100 mL per sample), homogenized for 60 seconds (Stomacher 400 circulator, Seward

99 Ltd., Easting Close, Sussex, UK), and subjected to microbiological analysis. As the
100 end ratio, 1 mL of the homogenate corresponded to 1 cm² of each sample.

101 ***Salmonella* spp. detection.** All samples were subjected to microbiological analysis
102 to detect *Salmonella* spp. according to ISO 6579 (ISO, 2002) with some
103 modifications. Aliquots of 40 mL of each sample homogenate (corresponding to 40
104 cm²) were centrifuged at 4 °C for 15 min at 1,000 × *g*. Then, the supernatant was
105 discarded and the pellet re-suspended with 10 mL of buffered peptone water at 1%
106 (w/v) and incubated at 37 °C for 24 h. The obtained cultures were transferred to
107 Rappaport-Vassiliadis and Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broths,
108 followed by incubation at 41.5 °C for 24 h and 37 °C for 24 h, respectively. Then,
109 the obtained cultures from both broths were streaked onto Xylose Lysine
110 Deoxycholate agar (XLD) and Mannitol Lysine Crystal Violet Brilliant Green agar
111 (MLCB) and incubated at 37 °C for 24 h. Suspected *Salmonella* spp. colonies were
112 transferred to Lysine Iron agar (LIA) and Triple Sugar Iron agar (TSI) slants; both
113 were incubated at 37 °C for 24 h. All culture media were from Oxoid.

114 Colonies that presented typical LIA and TSI reactions were streaked onto tryptic
115 soya agar (TSA, Oxoid) and incubated at 37 °C for 24 h; isolated colonies were
116 transferred to tryptic soya broth (TSB, Oxoid) and incubated at 37 °C for 24 h. The
117 obtained cultures were subjected to DNA extraction and purification using the
118 Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega Corp., Madison, WI, USA). Then,
119 the extracted DNAs were subjected to PCR to detect a sequence of the *ompC* gene
120 typical of *Salmonella* spp., according to the protocol described by Alvarez et al.
121 (2004) with some modifications. Reactions of 25 µL were composed of 2.0 µL of
122 DNA, 12.5 µL of GoTaq Green Master Mix (Promega), 8.5 µL of nuclease free
123 water (Promega), and 1 µL of each primers (both at 10 pmol/µL, 5'-

124 ATCGCTGACTTATGCAATCG-3', and 5'-CGGGTTGCGTTATAGGTCTG-3').

125 The PCR conditions were 95 °C for 2 min; then 30 cycles of 95 °C for 1 min, 57 °C

126 for 1 min, 72 °C for 2 min and a final extension at 72 °C for 5 min. The PCR

127 products were subjected to electrophoresis on 2.0 % (w/v) agarose gels, stained with

128 GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, USA) bath, and visualized in a

129 transilluminator. PCR products of 204 bp were considered as positive results for

130 *Salmonella* spp.

131 Based on the results, samples were classified as positive or negative for *Salmonella*

132 spp. on each 40 cm² of surface area sampled.

133 ***Xba*I macrorestriction and Pulsed Field Gel Electrophoresis.** Isolates identified as

134 *Salmonella* spp. by PCR, as described above, were subjected to DNA

135 macrorestriction and Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) according to Ribot et

136 al. (2006), using the protocol recommended by PulseNet (CDC, Atlanta, GA, USA).

137 Briefly, culture aliquots of each *Salmonella* spp. isolate were digested with 20 U of

138 *Xba*I (Promega) and the macrorestriction products were separated on agarose gels at

139 1% (w/v) by PFGE using the CHEF-DR II Variable Angle System (Bio-Rad Lab.,

140 Hercules, CA, USA) with the following parameters: 19 h, 120 ° and 6 V/cm gradient.

141 The obtained gels were stained with GelRed (Biotium) and visualized using a

142 transilluminator. Macrorestriction profiles were analyzed using BioNumerics 6.6

143 (Applied Maths, Gand, Belgium) considering an optimization of 1%, and a Dice

144 similarity of bands of 5%. The Unweighted Pair Group Method using Averages

145 (UPGMA) was used to cluster the obtained patterns.

146 **Virulence genes.** All isolates identified as *Salmonella* spp. by PCR were also

147 subjected to PCR protocols to detect virulence genes. The primers utilized in the

148 protocols were those described by Swamy et al. (1996) for *invA* (5'-

149 TTGTTACGGCTATTTTGACCA-3', and 5'-CTGACTGCTACCTTGCTGATG-3')
150 and *spvC* (5'-CGGAAATACCATCTACAAATA-3', and 5'-
151 CCCAAACCCATACTTACTCTG-3'), and by Woodward & Kirwan (1996) for *sefA*
152 (5'-GCAGCGGTTACTATTGCAGC-3', and 5'-TGTGACAGGGACAT1TTAGCG-
153 3'). For each pair of primers, PCR reactions of 25 μ L were composed of 12.5 μ L of
154 GoTaq Green Master Mix (Promega), 2.0 μ L of the DNA, 8.5 μ L of nuclease free
155 water (Promega), and 1 μ L of each primer (at 10 pmol/ μ L). For *invA* and *spvC*, the
156 PCR conditions were 93 °C for 5 min; then 30 cycles at 93 °C for 1 min, 42 °C for 1
157 min, and 72 °C for 2 min, followed by 72 °C for 5 min as final extension. For *sefA*,
158 the PCR conditions were 94 °C for 5 min; then 40 cycles at 94 °C for 1 min, 61 °C
159 for 1 min, and 72 °C for 1.5 min, followed by 72 °C for 5 min as final extension. The
160 PCR products were subjected to electrophoresis, stained and visualized as described
161 above. PCR products of 521 bp (*invA*), 669 bp (*spvC*), and 310 bp (*sefA*) were
162 considered as positive results for each respective screened gene.

163 **Antimicrobial resistance.** Considering the *XbaI* macrorestriction and PFGE
164 analysis, and also the result profiles for virulence genes, representative strains of
165 each identified pulse type were cultured in TSB (Oxoid) and incubated at 37 °C until
166 they reached a turbidity close to 0.5 on the MacFarland scale. Each culture was
167 swabbed on the surface of brain heart infusion agar (BHI, Oxoid) plates, and Etest®
168 stripes (bioMerieux, L'Etoile, France) with distinct antimicrobials were placed onto
169 the agar surfaces. The antimicrobials tested were: amikacin, cefotaxime, cefoxitin,
170 cephalothin, clindamycin, imipenem, kanamycin, minocycline, sulfamethoxazole,
171 tetracycline, tobramycin, and trimethoprim and sulfamethoxazole. Plates were
172 incubated at 37 °C for 24 h and the minimum inhibitory concentration for each
173 antimicrobial and strain was defined considering the presence of an inhibition halo

174 around the stripe. Based on these data, and considering manufacturer instructions and
175 CLSI (2008), the strains were classified as resistant (total or intermediate) or
176 sensitive to each antimicrobial.

177

178 RESULTS AND DISCUSSION

179

180 The positive result frequencies of analyzed samples for *Salmonella* spp. obtained for
181 each butcher shop are presented in Table 1. Of all the swab samples taken,
182 *Salmonella* spp. was found only from the surfaces of cutting boards. These food
183 contact surfaces have long been known to harbor pathogens like *Salmonella* spp.
184 because of their capacity to allow them to adhere and form biofilms on a variety of
185 materials, such as stainless steel and plastic (Hurrell et al., 2009; Vestby et al., 2009).
186 This result highlights the role of cutting boards in the cross contamination of
187 *Salmonella* spp. in butcher shop environments, indicating a possible source of
188 contamination of handled meat cuts and products and representing a hazard for
189 consumers (Kennedy et al., 2005; Mosupye & von Holy, 2000). Based on the
190 adherence capability of *Salmonella* spp. and its presence on cutting boards, the
191 necessity for effective cleaning procedures to reduce the chances of cross
192 contamination of finished products is evident (Moretro et al., 2009).
193 Berends et al. (1998) highlighted the relevance of continuous cleaning procedures for
194 *Salmonella* control in butcher shop environments and also identified cutting boards
195 as a relevant source of contamination by this foodborne pathogen, as observed in the
196 present study (Table 1). Previous studies identified a diversity of sources for
197 *Salmonella* spp. in butcher shop environments, including not only cutting boards but

198 also knives, tables and finished products such as pork cuttings and poultry (Cossi et
199 al., 2012; Hansen et al., 2010; Upadhyaya et al., 2012).

200 From the *Salmonella* spp. positive samples (Table 1), 15 isolates were obtained and
201 confirmed by PCR as possessing the *ompC* gene, involved in the production of
202 structural proteins from the outer membrane of *Salmonella* spp. and detected using
203 primers designed with specificity for this foodborne pathogen (Alvarez et al., 2004;
204 Kwang et al., 1996). As guidance, these isolates were named S01 to S15 and their
205 genetic profiles and PFGE analysis are presented in Figure 1. The isolates were
206 grouped in 4 pulse types sharing between 71.1 and 100% sequence similarity. It was
207 determined that isolates from butcher shops 1 and 4 presented identical genetic
208 profiles, indicating a common source of contamination by *Salmonella* spp. In
209 contrast, isolates from butcher shop 4 collected on distinct visits presented
210 differences in genetic profiles, indicating continuous contamination by different
211 *Salmonella* spp. strains in this environment. Previous studies demonstrated
212 continuous contamination by *Salmonella* in distinct food processing environments
213 and also the occurrence of identical strains in distinct locations, as observed in the
214 present study (Arguello et al., 2013; Xia et al., 2009; Yang et al., 2013).

215 Despite presenting identical genetic profiles by PFGE, the isolates presented distinct
216 patterns of results for the evaluated virulence genes (Figure 1). The PFGE protocol
217 adopted using *XbaI* is considered reliable for grouping *Salmonella* spp. (Gaul et al.,
218 2007; Ribot et al., 2006), but the observed diversity in the results for virulence genes
219 shared by isolates that presented identical genetic profiles suggests the necessity of
220 alternative tools for proper genetic grouping (Arguello et al., 2013). The assessed
221 virulence genes are deeply involved in the pathogenic mechanisms of *Salmonella*
222 spp. and their presence can be directly associated with the hazards of this foodborne

223 pathogen. *invA* was detected in 13 out of 15 isolates, being present in at least one
224 isolate from each pulse type (Figure 1); this gene is involved with enteric cell
225 invasion by *Salmonella* spp. and is often considered a target gene in molecular
226 protocols to detect this pathogen directly from food samples (Matias et al., 2010;
227 Turki et al., 2012). *sefA* was detected in 8 out of 15 isolates (Figure 1) and is
228 associated with fimbriae production and adhesion, without a clear and defined role in
229 the pathogenic mechanism of *Salmonella* spp. (Liu et al., 2011; Musa et al., 2013).
230 Despite the absence of positive results for *spvC* (Figure 1), this gene is considered
231 the most relevant in the pathogenic mechanism of *Salmonella* spp., being associated
232 with survival ability and multiplication in reticuloendothelial cells, and also with
233 inhibiting the innate immunity of the host (Kaeppeli et al., 2011).

234 The results for antimicrobial resistance and minimum inhibitory concentrations are
235 presented in Table 2. All selected isolates presented resistance to clindamycin and
236 sensitivity to amikacin and cefotaxime. Four isolates from pulse type I were selected
237 considering their results for virulence genes (Figure 1), and presented some
238 variations in antimicrobial resistance: S04 and S11 presented intermediate resistance
239 to cephalotin, whereas S03 and S05 were sensitive; S11 was resistant to imipenen,
240 whereas S03, S04 and S05 were sensitive; S03 presented intermediate resistance to
241 minocycline, whereas S04, S05, and S11 were resistant; and concerning tobramycin,
242 S03 presented intermediate resistance, S04 and S05 were resistant, and S11 was
243 sensitive. Despite the observed variations among strains from the same pulse type, all
244 isolates presented resistance to at least 3 of the 12 tested antimicrobials or their
245 combinations (Table 2).

246 The identification of strains that presented resistance to cephalothin is a concern
247 (Table 2), since this antimicrobial is usually employed in treating salmonellosis (Hur

et al., 2012). Another concern is the resistance of S11 observed regarding imipenen, considered by Hur et al. (2012) as one of the few options for treatment of *Salmonella* infections. The occurrence of *Salmonella* strains resistant to multiple antimicrobials is usually associated with the genetics of these microorganisms, but is also due to the use of sub-doses of antimicrobials in animal feed and disease treatment (Carramiñana et al., 2004). Based on this, the occurrence of multidrug resistant *Salmonella* strains in animal origin foods can easily be associated with the increasing number of salmonellosis cases and outbreaks that present difficult clinical treatment (Iroha et al., 2011; Oliveira et al., 2005; Zhao et al., 2003). *Salmonella* spp. is usually identified as resistant to multiple antimicrobials due to its ability to produce beta lactamases, enzymes that inhibit the activity of beta-lactam antibiotics (Hur et al., 2012; Iroha et al., 2011). Because of the presented resistance patterns, it is important to highlight that such strains were isolated from a butcher shop environment so consumers can be exposed to them, mainly due to the possibility of cross contamination at the retail level and also in their homes, representing a potential risk for them.

In conclusion, it was observed that cutting boards can be considered an important point of contamination by *Salmonella* spp. in butcher shop environments, mainly due to the possibility of cross contamination of finished products. Despite the observed low occurrence of this foodborne pathogen, the identification of isolates that presented virulence genes and also multiple drug resistance highlight the risk of *Salmonella* spp. for consumers.

ACKNOWLEDGMENTS

273 The authors thank the financial support and personnel grants from National Council
274 of Scientific and Technologic Development (CNPq), Coordination for the
275 Improvement of Personnel Higher Education (CAPES), and Foundation for
276 Supporting of Scientific and Technologic Development of Minas Gerais State
277 (FAPEMIG).

278

279 REFERENCES

280

281 Alvarez, J., Sota, M., Vivanco, A.B., Perales, I., Cisterna, R., Rementeria, A., &

282 Garaizar, J., 2004. Development of a multiplex PCR technique for detection and
283 epidemiological typing of *Salmonella* in human clinical samples. *Journal of*
284 *Clinical Microbiology* 42:1734-1738.

285 Arguello, H., Carvajal, A., Naharro, G., Arcos, M., Rodicio, M.R., Martin, M.C., &
286 Rubio, P., 2013. Sero- and genotyping of *Salmonella* in slaughter pigs, from farm
287 to cutting plant, with a focus on the slaughter process. *International Journal of*
288 *Food Microbiology* 161:44-52.

289 Berends, B.R., Van Knapen, F., Mossel, D.A.A., Burt, S.A., & Snijders, J.M.A.,
290 1998. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the
291 influence of particular risk factors. *International Journal of Food Microbiology*
292 44:207-217.

293 Carramiñana, J.J., Rota, C., Agustín, I., & Herrera, A., 2004. High prevalence of
294 multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry
295 slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology* 104:133-139.

296 Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R.M., 2012. Cross-
297 contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food*
298 *Research International* 45:545-556.

299 CLSI, 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility
 300 tests fro bacteria isolated from animals: Approved Standard. Clinical and
 301 Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

302 Cossi, M.V.C., Almeida, M.V., Dias, M.R., Pinto, P.S.A., & Nero, L.A., 2012.
 303 Inspected and non-inspected chilled chicken carcasses commercialized in Viçosa,
 304 MG, Brazil: microbiological parameters and *Salmonella* spp. occurrence. *Ciência*
 305 *Rural* 42:1675-1681.

306 Gaul, S.B., Wedel, S., Erdman, M.M., Harris, D.L., Harris, I.T., Ferris, K.E., &
 307 Hoffman, L., 2007. Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved *Xba*I
 308 fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes. *Journal of Clinical*
 309 *Microbiology* 45:472-476.

310 Hansen, T.B., Christensen, B.B., & Aabo, S., 2010. *Salmonella* in pork cuttings in
 311 supermarkets and butchers' shops in Denmark in 2002 and 2006. *Zoonoses and*
 312 *Public Health* 57:23-29.

313 Hur, J., Jawale, C., & Lee, J.H., 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella*
 314 isolated from food animals: a review. *Food Research International* 45:819-830.

315 Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., & Forsythe, S.J., 2009.
 316 Biofilm formation on enteral feeding tubes by *Cronobacter sakazakii*, *Salmonella*
 317 serovars and other Enterobacteriaceae. *International Journal of Food*
 318 *Microbiology* 136:227-231.

319 Iroha, I.R., Ugbo, E.C., Ilang, D.C., Oji, A.E., & E., A.T., 2011. Bacteria
 320 contamination of raw meat sold in Abakaliki, Ebonyi State Nigeria. *Journal of*
 321 *Public Health and Epidemiology* 3:49-53.

322 ISO, 2002. ISO 6579 - Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal
 323 method for the detection of *Salmonella* spp., p. 27. International Organization for
 324 Standardization, Geneva, Switzerland.

325 Kaeppli, R., Kaiser, P., Stecher, B., & Hardt, W.-D., 2011. Roles of *spvB* and *spvC*
 326 in *S. Typhimurium* colitis via the alternative pathway. *International Journal of*
 327 *Medical Microbiology* 301:117-124.

328 Kennedy, J., Jackson, V., Blair, I.S., McDowell, D.A., Cowan, C., & Bolton, D.J.,
 329 2005. Food safety knowledge of consumers and the microbiological and
 330 temperature status of their refrigerators. *Journal of Food Protection* 68:1421-
 331 1430.

332 Kwang, J., Littledike, E.T., & Keen, J.E., 1996. Use of the polymerase chain reaction
 333 for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology* 22:46-51.

334 Little, C.L., Richardson, J.F., Owen, R.J., de Pinna, E., & Threlfall, E.J., 2008.
 335 *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom:
 336 Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005.
 337 *Food Microbiology* 25:538-543.

338 Liu, B., Zhang, L., Zhu, X., Shi, C., Chen, J., Liu, W., He, X., & Shi, X., 2011. PCR
 339 identification of *Salmonella* serogroups based on specific targets obtained by
 340 comparative genomics. *International Journal of Food Microbiology* 144:511-518.

341 Matias, B.G., Pinto, P.S.A., Cossi, M.V.C., Silva, A., Jr., Vanetti, M.C.D., & Nero,
 342 L.A., 2010. Evaluation of a polymerase chain reaction protocol for the detection
 343 of *Salmonella* species directly from superficial samples of chicken carcasses and
 344 preenrichment broth. *Poultry Science* 89:1524-1529.

345 Moretro, T., Vestby, L.K., Nesse, L.L., Storheim, S.E., Kotlarz, K., & Langsrud, S.,
346 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed
347 industry. *Journal of Applied Microbiology* 106:1005-1012.

348 Mosupye, F.M. & von Holy, A., 2000. Microbiological hazard identification and
349 exposure assessment of street food vending in Johannesburg, South Africa.
350 *International Journal of Food Microbiology* 61:137-145.

351 Musa, H.-H., Zhang, W.-J., Lv, J., Duan, X.-L., Yang, Y., Zhu, C.-H., Li, H.-F.,
352 Chen, K.-W., Meng, X., & Zhu, G.-Q., 2013. The molecular adjuvant mC3d
353 enhances the immunogenicity of FimA from type I fimbriae of *Salmonella*
354 *enterica* serovar Enteritidis. *Journal of Microbiology, Immunology and*
355 *Infection*:1-6.

356 Oliveira, S.D., Flores, F.S., Santos, L.R., & Brandelli, A., 2005. Antimicrobial
357 resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food,
358 human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology*
359 97:297-305.

360 Rhoades, J.R., Duffy, G., & Koutsoumanis, K., 2009. Prevalence and concentration
361 of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria*
362 *monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiology*
363 26:357-376.

364 Ribot, E.M., Fair, M.A., Gautom, R., Cameron, D.N., Hunter, S.B., Swaminathan,
365 B., & Barrett, T.J., 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis
366 protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157 : H7 *Salmonella*, and
367 *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathogens and Disease* 3:59-67.

368 Stevens, A., Kerouanton, A., Marault, M., Millemann, Y., Brisabois, A., Cavin, J.-F.,
369 & Dufour, B., 2008. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef

370 sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field
 371 gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *International Journal of*
 372 *Food Microbiology* 123:191-197.

373 Swamy, S.C., Barnhart, H.M., Lee, M.D., & Dreesen, D.W., 1996. Virulence
 374 determinants *invA* and *spvC* in *Salmonella* isolated from poultry products,
 375 wastewater, and human sources. *Applied and Environmental Microbiology*
 376 62:3768-3771.

377 Turki, Y., Ouzari, H., Mehri, I., Ben Aissa, R., & Hassen, A., 2012. Biofilm
 378 formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky
 379 isolated in Tunisia. *Food Research International* 45:940-946.

380 Upadhyaya, M., Poosaran, N., & Fries, R., 2012. Prevalence and predictors of
 381 *Salmonella* spp. in retail meat shops in Kathmandu. *Journal of Agricultural*
 382 *Science and Technology* 2:1094-1106.

383 Vestby, L.K., Moretro, T., Langsrud, S., Heir, E., & Nesse, L.L., 2009. Biofilm
 384 forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and
 385 feed factories. *BMC Veterinary Research* 5.

386 Voidarou, C., Alexopoulos, A., Plessas, S., Stavropoulou, E., Fotou, K., Tzora, A.,
 387 Skoufos, I., & Bezirtzoglou, E., 2011. Hygienic quality and antibiotic resistance
 388 profile of sliced butchery. *Anaerobe* 17:344-350.

389 Woodward, M.J. & Kirwan, S.E.S., 1996. Detection of *Salmonella* enteritidis in eggs
 390 by the polymerase chain reaction. *Veterinary Record* 138:411-413.

391 Xia, X., Zhao, S., Smith, A., McEvoy, J., Meng, J., & Bhagwat, A.A., 2009.
 392 Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping,
 393 pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic
 394 properties. *International Journal of Food Microbiology* 129:93-98.

395 Yang, B., Qiao, L., Zhang, X., Cui, Y., Xia, X., Cui, S., Wang, X., Meng, X., Ge,
396 W., Shi, X., Wang, D., & Meng, J., 2013. Serotyping, antimicrobial susceptibility,
397 pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in
398 Henan Province, China. *Food Control* 32:228-235.

399 Zhao, S., Datta, A.R., Ayers, S., Friedman, S., Walker, R.D., & White, D.G., 2003.
400 Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods.
401 *International Journal of Food Microbiology* 84:87-92.

402
403

Table 1. Frequencies of positive results for *Salmonella* spp. in surface samples of environmental points from four butcher shops located in Viçosa, Minas Gerais, Brazil.

Butcher shops point*	n	Butcher shop				Total
		1	2	3	4	
employees hands	32	0	0	0	0	0
cutting board	32	1	1	0	3	5
knife	32	0	0	0	0	0
floor of refrigerated	32	0	0	0	0	0
meat grinder	32	0	0	0	0	0
meat tenderizer	32	0	0	0	0	0

* sampled area per point: 100 cm². For employees hands, the front (palm) and fingers of the hands were sampled in order to complete 100 cm².

Table 2. Minimum inhibitory concentration values ($\mu\text{g/mL}$) and resistance patterns (R: resistance, I: intermediate resistance, S: sensitivity) of *Salmonella* spp. strains isolated from chopping boards from four distinct butcher shops located in Viçosa, Minas Gerais State, Brazil, related to distinct antimicrobial substances. Results obtained by Etest® stripes (bioMérieux); AB: absence of halo formation, indicating resistance.

Antimicrobials	Strain (pulsetype*)						
	S01 (III)	S02 (IV)	S03 (I)	S04 (I)	S05 (I)	S09 (II)	S11 (I)
amikacin	3.0 (S)	3.0 (S)	1.5 (S)	2.0 (S)	1.5 (S)	3.0 (S)	2.0 (S)
cefotaxime	6.0 (S)	0.094 (S)	0.125 (S)	0.25 (S)	0.19 (S)	0.047 (S)	0.032 (S)
cefoxitin	AB (R)	32.0 (R)	4.0 (S)	8.0 (S)	6.0 (S)	1.0 (S)	6.0 (S)
cephalothin	AB (R)	AB (R)	12.0 (S)	16.0 (I)	12.0 (S)	2.0 (S)	16.0 (I)
clindamycin	AB (R)	32.0 (R)	AB (R)	AB (R)	AB (R)	AB (R)	AB (R)
imipenem	0.75 (S)	0.125 (S)	0.25 (S)	0.25 (S)	0.19 (S)	0.25 (S)	25.0 (R)
kanamycin	32.0 (I)	3.0 (S)	4.0 (S)	8.0 (S)	3.0 (S)	4.0 (S)	3.0 (S)
minocycline	AB (R)	2.0 (S)	8.0 (I)	16.0 (R)	12.0 (R)	16.0 (R)	32.0 (R)
sulfamethoxazole	AB (R)	12.0 (S)	AB (R)	AB (R)	AB (R)	AB (R)	AB (R)
tetracycline	AB (R)	1.0 (S)	AB (R)	192 (R)	128 (R)	AB (R)	48.0 (R)
tobramycin	1.0 (S)	2.0 (S)	8.0 (I)	12.0 (R)	12.0 (R)	2.0 (S)	4.0 (S)
trimethoprim and sulfamethoxazole	AB (R)	0.047 (S)	AB (R)	AB (R)	AB (R)	25.0 (R)	AB (R)

* according clusters from Figure 1.

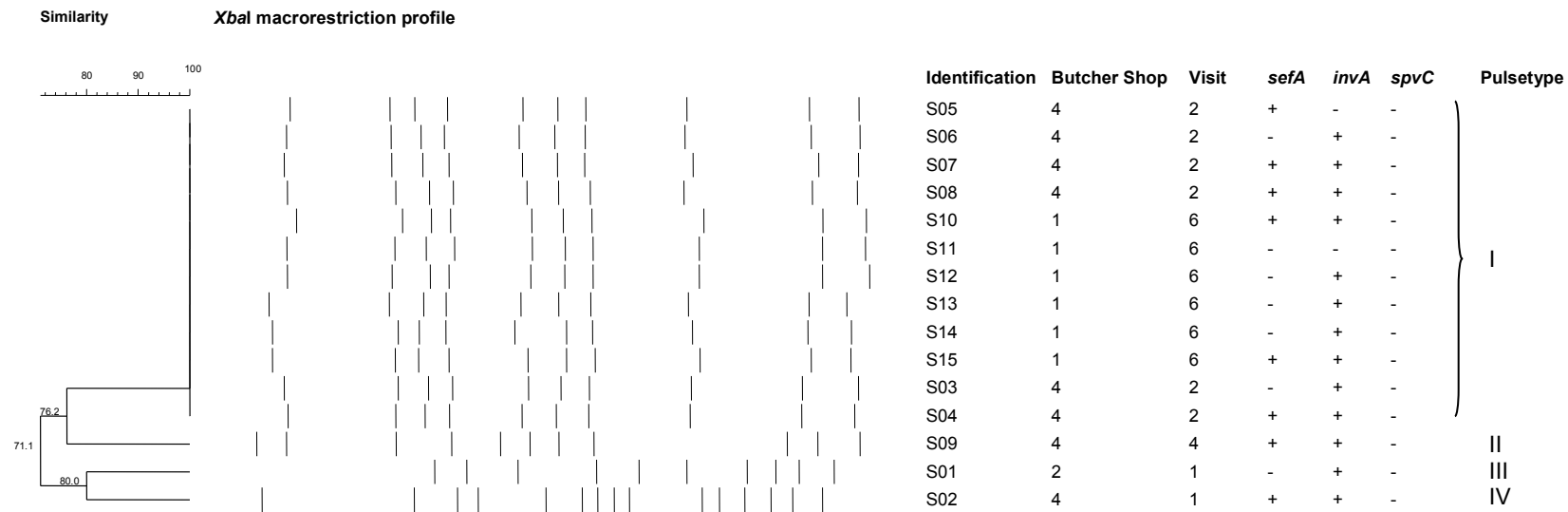


Figure 1. Schematic representation of the obtained PFGE pulsetypes after DNA macrorestriction (*Xba*I) of 15 *Salmonella* spp. isolates obtained from chopping boards from 4 distinct butcher shops, after 8 visits for sampling, and results for the occurrence of virulence genes (*sefA*, *invA*, and *spvC*) detected by PCR. Similarities between the identified PFGE pulsetypes were estimated using the Dice coefficient (5% tolerance).

CAPÍTULO 3. Uso associado de técnicas genotípicas e fenotípicas para agrupamento de
***Salmonella* spp obtidos de frigoríficos em Minas Gerias, Brasil.**

Artigo científico a ser submetido para publicação

Resumo

Salmonella spp. é um patógeno frequentemente associado a alimentos de origem animal, e a contaminação em produtos finais pode ocorrer em diferentes etapas do processamento. Embora técnicas fenotípicas sejam úteis para identificar sorotipos de *Salmonella* spp. usualmente associados a surtos de toxinfecções alimentares, técnicas moleculares devem ser associadas para permitir um rastreamento epidemiológico preciso e caracterizar adequadamente os fatores de virulência dos isolados. Com o objetivo de avaliar o agrupamento obtido através da associação entre técnicas genotípicas e técnicas fenotípicas de caracterização de *Salmonella* spp., 20 isolados obtidos de carcaças bovinas e previamente identificados por testes sorológicos foram submetidos a macro-restrição com *Xba*I e PFGE, detecção de 16 genes associados a patogenicidade e perfil de resistência a 13 antimicrobianos. A análise por PFGE permitiu a definição de 10 pulsotipos (I a X), dos quais três (I, IV e VII) apresentaram mais de um isolado. Isolados que apresentaram o mesmo perfil genético também apresentaram a mesma identificação de sorotipo. Em relação à presença de genes de virulência, observou-se similaridade de resultados entre os isolados de um mesmo pulsotipo, observação mais evidente em genes de virulência localizados principalmente em ilhas de patogenicidades e genes frequentemente associados à plasmídeos. A maioria dos isolados pertencentes a um mesmo pulsotipo também obtiveram resultados idênticos de sensibilidade a diferentes antimicrobianos. Os resultados obtidos demonstram que técnicas genotípicas devem ser associadas a técnicas fenotípicas para permitir o agrupamento de isolados de *Salmonella* spp. em estudos epidemiológicos.

Palavras-chave: *Salmonella*, PFGE, sorotipos, genes de patogenicidade

1. Introdução

Salmonella spp é um dos patógenos mais associados à toxinfecções alimentares, sendo responsável anualmente por mais de 93,8 milhões de casos no mundo e mais de 155.000 mortes (Almeida et al., 2013). A infecção causada por este patógeno é associada principalmente ao consumo de alimentos de origem animal contaminados durante o processamento (Almeida et al., 2013; Campioni et al., 2012; Favier et al., 2013).

A capacidade de *Salmonella* spp. em infectar o hospedeiro e causar doença pode ser avaliada pela resistência imunológica do hospedeiro ou através das características relacionadas a patogenicidade do micro-organismo. Uma das características avaliadas é a presença e expressão de genes de virulência que podem estar associados à plasmídeos, como os genes *spvC* e *spvB*, e também associados à ilhas de patogenicidade (SPI-1 e SPI-2) como os genes *invA*, *orgA*, *prgH*, *spaN*, *sipB*, *sitC*, *pagC*, *msgA*, *spiA*, *sopB*, *lpfC* e *sifA* (Almeida et al., 2013; Campioni et al., 2012; Skyberg et al., 2006). Outra importante característica relacionada com a patogenicidade deste micro-organismo é sua resistência a antimicrobianos, o que tem alertado agências de saúde pública em diversos países, principalmente devido a identificação de isolados resistentes a múltiplas drogas (Bolton et al., 2013; Dione et al., 2011).

Considerando o potencial patogênico de *Salmonella* spp, o seu controle deve ser realizado em toda a cadeia produtiva de alimentos, utilizando-se metodologias que permitam a identificação de potenciais rotas de contaminação. As ferramentas mais tradicionais utilizadas com essa finalidade são a sorotipagem e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, porém possuem como desvantagem a

baixa reprodutibilidade e a pouca capacidade de diferenciar sorotipos (Campioni et al., 2012; Chen et al., 2012). Por outro lado, técnicas moleculares têm sido alternativas eficazes na tipificação de isolados bacterianos, como a macro-restrição do DNA seguida por eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), que é considerada o padrão ouro e uma importante ferramenta para a correlação genética de patógenos envolvidos em surtos (Almeida et al., 2013; Campioni et al., 2012; Mezal et al., 2014).

Diferenças entre o potencial de agrupamento entre técnicas genotípicas e fenotípicas têm sido observadas em vários estudos, sendo que no Brasil a maioria dos trabalhos epidemiológicos são conduzidos com metodologias fenotípicas (Fernandes et al., 2003; Fernandes et al., 2006; Kottwitz et al., 2011). Por estas razões, o presente trabalho teve por objetivo analisar a capacidade discriminatória da associação de técnicas fenotípicas e genotípicas para o agrupamento de isolados de *Salmonella* spp. obtidos durante o abate de bovinos em frigoríficos localizados no estado de Minas Gerais, Brasil.

2. Material e Métodos

2.1. Micro-organismos

Em um estudo previamente conduzido pela equipe dessa pesquisa, que teve como objetivo identificar os principais pontos de contaminação por *Salmonella* spp. em carcaças bovinas, 20 isolados foram identificados por testes sorológicos e seus perfis genéticos definidos por macro-restrição com *Xba*I e PFGE (Cossi et al., 2014). Os perfis de restrição, sorotipos e os pulsotipos dos isolados são apresentados na Figura 1. Os isolados foram mantidos em caldo tripticase de soja (TSB, Oxoid

Ltd., Basingstoke, Inglaterra) adicionado de glicerol a 20% (v/v) a -20 °C. Para utilização no presente estudo, as culturas eram transferidas para TSB (Oxoid), incubadas a 37 °C por 24h.

2.2. Identificação de genes associados à patogenicidade

As culturas foram submetidas à extração e purificação do DNA pelo kit *Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corp., Madison, WI, EUA). Após a extração, reações de PCR foram realizadas para a identificação de genes de virulência. Para a realização dessas reações, os primers utilizados foram descritos previamente por Skyberg et al. (2006) para os genes *cdtB*, *sifA*, *ironN*, *spiA*, *sitC*, *pagC*, *msgA*, *orgA*, *sipB*, *spvB*, *tolC*, *prgH*, *sopB* e *spaN*, e por Swamy et al. (1996) para os genes *invA* e *spvC* (Tabela 1). Para cada par de primer, preparou-se uma reação de PCR com volume total de 25 µL composto por 12,5 µL de GoTaq Green Master Mix (Promega), 8,5 µL de água nuclease-free, 1 µL de cada primer (Forward e Reverse) diluído a 10 pmol/µL e 2,0 µL de DNA do isolado.

As condições de PCR para amplificação dos genes *cdtB*, *sifA*, *ironN*, *spiA*, *sitC*, *pagC*, *msgA*, *orgA*, *sipB*, *spvB*, *tolC*, *prgH*, *sopB* e *spaN* foram: 95° C por 5 min.; 25 ciclos a 94° C por 30 seg., 66,5° C por 30 seg., 72° C por 2 min.; extensão final de 72° C por 10 min. Para o gene *invA* e *spvC*, foram: 93° C por 5 min., 30 ciclos de 93° C por 1 min., 42° C por 1 min., 72° C por 2 min., e um extensão final a 72° C por 5 min. Os produtos de PCR foram submetidos a separação em gel de eletroforese e posteriormente corados com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). Os isolados foram considerados positivos quando os tamanhos dos produtos de amplificação obtidos foram iguais aos indicados na Tabela 1.

2.3. Resistência a antimicrobianos

As culturas obtidas foram diluídas em TSB até atingirem turbidez próxima a escala 0,5 de MacFarland, e então distribuídas na superfície de uma placa de petri contendo caldo infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid) suplementado com ágar a 15% (m/v), com o auxílio de um swab estéril. Em seguida, fitas de Etest (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) contendo diferentes antimicrobianos (amicacina, cefotaxima, cefoxitina, cefalotina, clindamicina, imipenem, canamicina, minociclina, sulfametoxazol, tetraciclina, tobramicina, sulfametoxazol-trimetoprima e ciprofloxacina) foram colocadas sobre a superfície e incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após incubação, o halo de inibição de crescimento formado ao redor de cada fita foi utilizado para indicar a Concentração Mínima Inibitória (MIC). Com o valor de MIC, cada isolado foi classificado em resistente (total ou parcial) e sensível ao antimicrobiano segundo especificações do fabricante (CLSI, 2012).

2.4. Análise de dados

Considerando os resultados de presença de genes de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos, foram verificados potenciais associações com os perfis genéticos previamente obtidos por PFGE (Cossi et al., 2014). Sabendo que há diferença de conservação de determinadas regiões do genoma bacteriano, a comparação entre os perfis de restrição e a presença de genes de virulência foi feita em 3 grupos: Grupo 1, composto pelos genes localizados nas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* spp. (*invA*, *orgA*, *prgH*, *spaN*, *sipB*, *sitC*, *pagC*, *msgA*, *spiA*, *sopB*, *lpfC* e *sifA*); Grupo 2, composto por genes de virulência frequentemente associados à plasmídeos (*spvC* e *spvB*); e Grupo 3, composto por genes localizados em outras

regiões do DNA bacteriano (*cdtB*, *iroN* e *tolC*). Adicionalmente, os resultados obtidos na caracterização dos perfis de resistência a diferentes antimicrobianos foram agrupados considerando os pulsotipos identificados por PFGE (Figura 1).

3. Resultados e Discussão

Estudos preliminares realizados com os 20 isolados de *Salmonella* spp. obtidos em etapas da linha de processamento de carne bovina, identificaram 10 pulsotipos pela técnica de PFGE, como pode ser observado na Figura 1 (Cossi et al., 2014). Considerando a identificação sorológica realizada, é possível identificar que isolados com um mesmo pulsotipo pertenceram a um mesmo sorotipo (Figura 1). Como já demonstrado por outros estudos, esta técnica é considerada o padrão ouro para a realização de agrupamento genético de isolados e representa uma ótima opção para o estudo de surtos e identificação de rotas de contaminação (Campioni et al., 2012; Favier et al., 2013; Mezal et al., 2014). Adicionalmente, tem-se observado que a utilização do PFGE associada a outras formas de agrupamento, como perfis de resistência a antimicrobianos e presença de genes de virulência, podem melhorar a tipificação dos isolados (Chen et al., 2012). Por esta razão, os resultados obtidos para presença de 16 genes de virulência foram agrupados considerando os perfis de restrição obtidos pelo PFGE e estão apresentados na Tabela 2.

Inicialmente observa-se a ocorrência de vários isolados com resultados positivos para diferentes genes de virulência, sendo que todos os isolados apresentaram simultaneamente pelo menos sete dos 16 genes testados (Tabela 2). Ainda considerando a ocorrência simultânea desses genes, deve ser dado destaque a nove isolados que apresentaram 14 dos 16 genes testados (Tabela 2). A alta

ocorrência de isolados positivos para múltiplos genes de virulência já foi descrita por diversos autores e demonstra o potencial perigo de *Salmonella* spp. para a saúde pública (Campioni et al., 2012; Mezal et al., 2014). Comparando os perfis de restrição e os perfis de resultados para presença desses genes, observa-se que os seis isolados do pulsotipo I (Figura 1) apresentaram resultados idênticos para os genes de virulência do grupo 1 (localizados em ilhas de patogenicidade) e do grupo 2 (localizados usualmente em plasmídeos), e algumas diferenças para o genes do grupo 3 (localizados em outros locais do DNA) (Tabela 2). Em relação aos isolados do pulsotipo VI (Figura 1), ocorreram diferenças nos padrões de resultados para os genes dos grupos 1 e 3, e resultados idênticos para os genes do grupo 2 (Tabela 2), enquanto os isolados do pulsotipo VII (Figura 1) apresentaram pequenas diferenças nos resultados dos 3 grupos de genes testados. (Tabela 2).

De maneira geral, pode-se identificar que genes relacionados a patogenicidade localizados em ilhas de patogenicidade e em plasmídeos de *Salmonella* spp. tenderam a apresentar padrões de positividade semelhantes em isolados pertencentes a um mesmo pulsotipo, enquanto genes localizados em outros locais do DNA apresentaram maior variabilidade de resultados positivos entre isolados de um mesmo pulsotipo (Tabela 2). Chen et al. (2012) descreveram essa tendência de genes de *Salmonella* spp. localizados em ilhas de patogenicidade em possuírem alta conservação e serem estáveis, como observado no presente estudo (Tabela 2). Chen et al. (2012) também indicam que genes usualmente localizados em plasmídeos tendem a ser menos conservados, o que não foi observado no presente estudo (Tabela 2); entretanto, como a obtenção do material genético dos isolados não foi realizada considerando isoladamente os seus plasmídeos, não há evidências que os genes pesquisados efetivamente estão presentes nesses locais (*spvC* e *spvB*).

Outra observação importante foi a ausência de genes de virulência usualmente localizados em plasmídeos no isolado identificado como *Salmonella* Infantis (isolado S01, Figura 1 e Tabela 2), confirmando estudo conduzido por Almeida et al. (2013). Adicionalmente, Moraes et al. (2000) descreveram a associação direta de *Salmonella* Dublin com genes relacionados a patogenicidade usualmente localizados em plasmídeos, um resultado que também foi observado no presente estudo, uma vez que todos os isolados desse sorotipo apresentaram os genes do grupo 2 (Tabela 2).

Considerando os resultados de resistência a antimicrobianos agrupados conforme os pulsotipos obtidos por PFGE (Tabela 3), apenas os isolados do pulsotipo I apresentaram perfis de resistência idênticos, sendo todos sensíveis aos antimicrobianos testados, exceto para sulfametoxazol e clindamicina. Em relação aos isolados do pulsotipo VI, foram observados dois perfis de resistência: três dos quatro isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, exceto tetraciclina, sulfametoxazol e clindamicina, e um isolado foi resistente também a sulfametoxazol-trimetoprima (Tabela 3). Finalmente, dois dos três isolados do pulsotipo VII foram sensíveis a todos os antimicrobianos avaliados, exceto sulfametoxazol e clindamicina, e um isolado apresentou resistência a oito antimicrobianos (Tabela 3).

Isolados identificados como *Salmonella* Dublin apresentaram diferentes perfis de restrição enzimática, sendo observados nos pulsotipos I e IV (Figura 1), e todos apresentaram idênticos perfis de resistência a antimicrobianos (Tabela 3). Em contrapartida, isolados pertencentes a outros sorotipos apresentaram variação nos perfis de resistência a antimicrobianos (Tabela 3). Em estudo conduzido por Li et al. (2013), é apresentado uma discussão da possível relação entre o sorotipo de

Salmonella e seu perfil de resistência à antimicrobianos, com demonstração para os sorotipos Typhimurium e Indiana.

A baixa frequência de isolados resistentes a sulfametoxazol-trimetoprima (2/20, Tabela 3) já foi descrita previamente em estudos similares (Campioni et al., 2012; Castro et al., 2002), entretanto outros trabalhos encontraram altas frequências de isolados resistentes a essa combinação de antimicrobianos (Chen et al., 2012; Favier et al., 2013; Li et al., 2013). Em relação a tetraciclina, sete isolados apresentaram resistência (Tabela 3), um resultado similar ao obtido por Mezal et al. (2014) e inferior a frequências de resistência descritas em outros estudos (Chen et al., 2012; Favier et al., 2013; Li et al., 2013).

A maior parte dos isolados caracterizados neste estudo apresentou sensibilidade a ciprofloxacina, canamicina e cefotaxima, como observado em outros estudos (Chen et al., 2012; Favier et al., 2013; Li et al., 2013). Mesmo havendo isolados sensíveis a diversos antimicrobianos, pôde-se observar também a existência de isolados resistentes a múltiplas drogas sendo que todos foram resistentes a pelo menos dois antimicrobianos (sulfametoxazol e clindamicina) e o isolado S20 resistente a oito drogas testadas. A resistência a múltiplas drogas é uma preocupação para a saúde pública, pois dificulta o tratamento de pessoas com salmonelose e é um reflexo direto do uso indiscriminado de antimicrobianos e da pressão seletiva criada sobre os micro-organismos (Carramiñana et al., 2004; Hur et al., 2012; Van et al., 2012).

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram a vantagem da aplicação conjunta de técnicas fenotípicas e genotípicas no agrupamento de isolados de *Salmonella* spp. e o quanto isso pode auxiliar na tipificação de isolados. Este tipo de análise é útil durante estudos epidemiológicos de associação de isolados e surtos,

assim como na identificação de possíveis rotas de contaminação, pois, avalia não apenas os perfis de restrição de DNA dos isolados, mas também a similaridade de características fenotípicas que podem ser decisivas para a saúde pública.

Referências Bibliográficas

- Almeida, F., Pitondo-Silva, A., Oliveira, M.A., & Falcão, J.P., 2013. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. *Infection, Genetics and Evolution* 19:145-151.
- Bolton, D.J., Ivory, C., & McDowell, D., 2013. A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: Serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. *International Journal of Food Microbiology* 160:298-303.
- Campioni, F., Bergamini, A.M.M., & Falcão, J.P., 2012. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiology* 32:254-264.
- Carramiñana, J.J., Rota, C., Agustín, I., & Herrera, A., 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology* 104:133-139.
- Castro, F.A., dos Santos, V.R., Gomes Martins, C.H., Fernandes, S.A., Zaia, J.E., & Martinez, R., 2002. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. *Brazilian Journal Infectious Diseases* 6:244-251.
- Chen, M.-H., Chiou, C.-S., Chiang, Y.-C., Chen, P.-H., Tsai, S.-W., & Tsen, H.-Y., 2012. Comparison of the pulsed field gel electrophoresis patterns and virulence profiles of the multidrug resistant strains of *Salmonella enterica* serovar

- Schwarzengrund isolated from chicken meat and humans in Taiwan. *Food Research International* 45:978-983.
- Cossi, M.V.C., Burin, R.C.K., Camargo, A.C., Dias, M.R., Lanna, F.G.P.A., Pinto, P.S.A., & Nero, L.A., 2014. Low occurrence of *Salmonella* in the beef processing chain from Minas Gerais state, Brazil: from bovine hides to end cuts. *Food Control* 40:320-323.
- Dione, M.M., Ikumapayi, U., Saha, D., Mohammed, N.I., Adegbola, R.A., Geerts, S., Ieven, M., & Antonio, M., 2011. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal. *Journal of Infections Developing Countries* 5:765-775.
- Favier, G.I., Lucero Estrada, C.S.M., Lazarte Otero, V., & Escudero, M.E., 2013. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. *Food Control* 29:49-54.
- Fernandes, S.A., Ghilardi, A.C., Tavechio, A.T., Machado, A.M.O., & Pignatari, A.C.C., 2003. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 45:59-63.
- Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., Ghilardi, A.C., Dias, A.M., Almeida, I.A., & Melo, L.C., 2006. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 48.
- Hur, J., Jawale, C., & Lee, J.H., 2012. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. *Food Research International* 45:819-830.
- Kottwitz, L.B.M., Scheffer, M.C., Dalla-Costa, L.M., Farah, S.M.S.S., Moscalewski, W.S.B., Magnani, M., & Oliveira, T.C.R.M., 2011. Molecular characterization

- and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. *Journal of Medical Microbiology* 60:1026-1031.
- Li, R., Lai, J., Wang, Y., Liu, S., Li, Y., Liu, K., Shen, J., & Wu, C., 2013. Prevalence and characterization of *Salmonella* species isolated from pigs, ducks and chickens in Sichuan Province, China. *International Journal of Food Microbiology* 163:14-18.
- Mezal, E.H., Sabol, A., Khan, M.A., Ali, N., Stefanova, R., & Khan, A.A., 2014. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. *Food Microbiology* 38:67-74.
- Moraes, B.A., Cravo, C.A.N., Loureiro, M.M., Solari, C.A., & Asensi, M.D., 2000. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a University Hospital from Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 42:201-207.
- Skyberg, J.A., Logue, C.M., & Nolan, L.K., 2006. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. *Avian Diseases* 50:77-81.
- Swamy, S.C., Barnhart, H.M., Lee, M.D., & Dreesen, D.W., 1996. Virulence determinants *invA* and *spvC* in *Salmonella* isolated from poultry products, wastewater, and human sources. *Applied and Environmental Microbiology* 62:3768-3771.
- Van, T.T., Nguyen, H.N., Smooker, P.M., & Coloe, P.J., 2012. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *International Journal of Food Microbiology* 154:98-106.

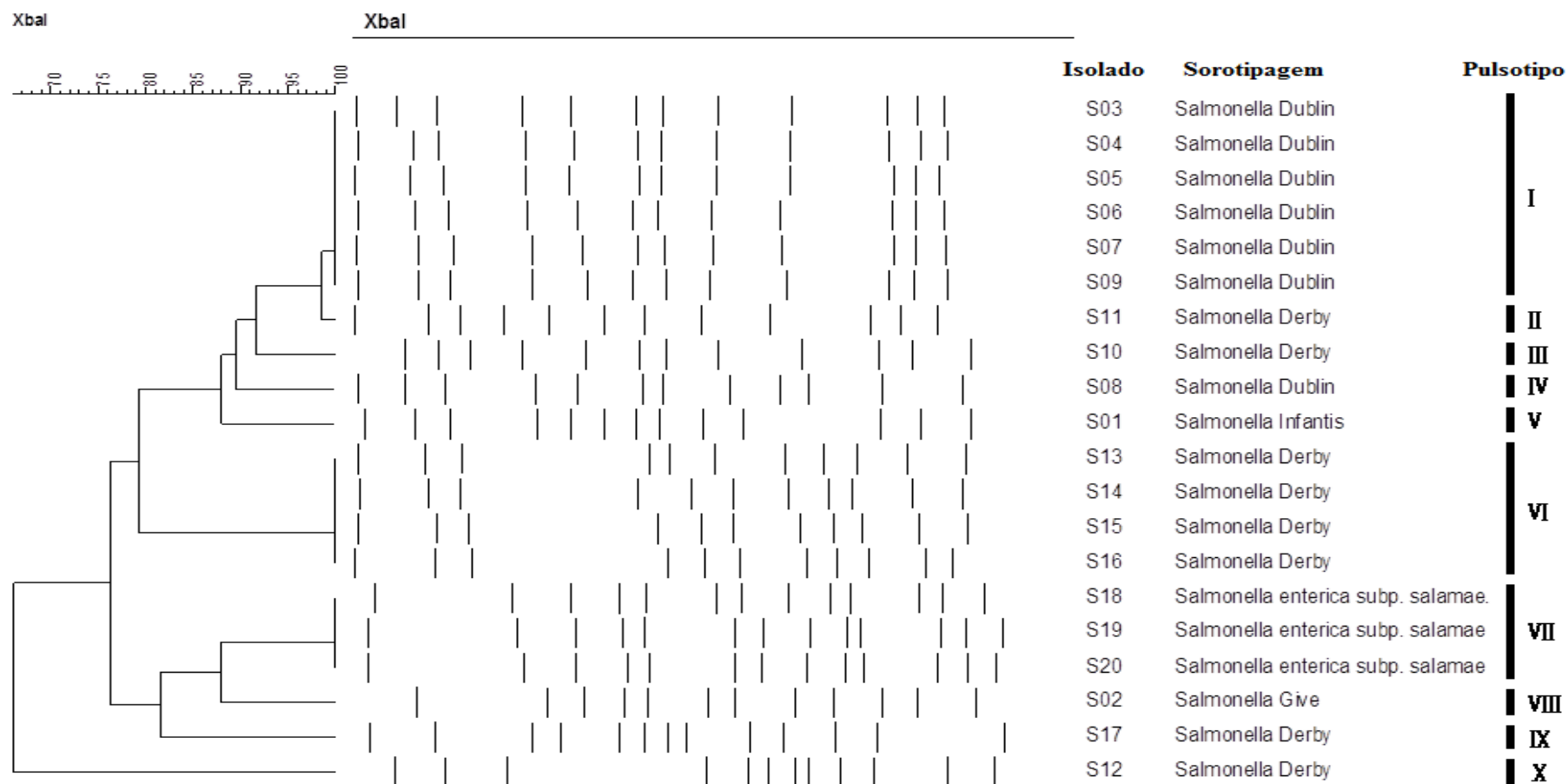


Figura 1. Apresentação esquemática dos pulsotipos obtidos por PFGE após a macrorestrição do DNA (*Xba*I) de 20 isolados de *Salmonella* spp. obtidos na carcaça de bovinos abatidos em frigoríficos localizados em Minas Gerais, Brasil. Perfis de similaridade entre os isolados de *Salmonella* spp foram estimados através do coeficiente Dice (5% de tolerância). Figura adaptada de Cossi et al. (2014).

Tabela 1. Tabela indicando os primers utilizados para cada gene relacionado à patogenicidade.

gene	primers	pb	referência
<i>cdtB</i>	F: ACAACTGTTCGCATCTCGCCCCGTCATT R: CAATTTGCGTGGGTCTGTAGGTGCGAGT	268	Skyberg et al. (2006)
<i>sifA</i>	F: TTTGCCGAACGCGCCCCACACG R: GTTGCCTTTTCTTGCGCTTTCCACCCATCT	449	
<i>iroN</i>	F: ACTGGCACGGCTCGCTGTCGCTCTAT R: CGCTTTACCGCCGTTCTGCCACTGC	1205	
<i>spiA</i>	F: CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG R: CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550	
<i>sitC</i>	F: CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC R: CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768	
<i>pagC</i>	F: CGCCTTTTCCGTGGGGTATGC R: GAAGCCGTTTATTTTGTAGAGGAGATGTT	454	
<i>msgA</i>	F: GCCAGGCGCACGCGAAATCATCC R: GCGACCAGCCACATATCAGCCTCTTCAAAC	189	
<i>orgA</i>	F: TTTTGGCAATGCATCAGGGAACA R: GCGGAAAGCGGGGACGGTATT	255	
<i>sipB</i>	F: GGACGCCGCGCGGAAAACTCTC R: AACTCCCGTCGCGCCTTCACAA	875	
<i>spvB</i>	F: CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA R: GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	717	
<i>tolC</i>	F: TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC R: CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	161	
<i>prgH</i>	F: GCCCGAGCAGCCTGAGAAGTTAGAAA R: TGAAATGAGCGCCCCTTGAGCCAGTC	756	
<i>sopB</i>	F: CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG R: TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	220	
<i>spaN</i>	F: AAAAGCCGTGGAATCCGTTAGTGAAGT R: CAGCGCTGGGGATTACCGTTTTG	504	
<i>invA</i>	F: TTGTTACGGCTATTTTGACCA R: CTGACTGCTACCTTGCTGATG	521	Swamy et al. (1996)
<i>spvC</i>	F: CGGAAATACCATCTACAAATA R: CCCAAACCCATACTTACTCTG	669	

Tabela 2. Resultado da comparação entre pulsotipos e presença de genes de virulência de isolados de *Salmonella* spp

Pulsotipo	isolado	Genes de virulência divididos por localização no genoma bacteriano															
		1 – Ilha de patogenicidade											2 – Plasmídeo*		3 – Outras regiões		
		<i>invA</i>	<i>sifA</i>	<i>spiA</i>	<i>sitC</i>	<i>pagC</i>	<i>msgA</i>	<i>orgA</i>	<i>sipB</i>	<i>prgH</i>	<i>sopB</i>	<i>spaN</i>	<i>spvC</i>	<i>spvB</i>	<i>cdtB</i>	<i>iroN</i>	<i>tolC</i>
I	S03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	S04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	S05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
	S06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	S07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	S09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
II	S11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
III	S10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
IV	S08	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
V	S01	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
VI	S13	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	S14	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	S15	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	S16	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
VII	S18	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
	S19	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+
	S20	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
VIII	S02	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
IX	S17	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
X	S12	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+

*Genes frequentemente associados à plasmídeos.

Tabela 3. Resultados da comparação entre pulsotipos e perfis de resistência a antimicrobianos de isolados obtidos no frigorífico.

Pulsotipo	isolado	Antimicrobianos												
		AK	CT	KM	MC	TC	TS	TM	CE	SX	CM	IP	FX	CI
I	S03	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
	S04	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
	S05	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
	S06	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
	S07	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
	S09	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
II	S11	S	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
III	S10	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
IV	S08	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
V	S01	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
VI	S13	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S
	S14	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S
	S15	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S
	S16	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S
VII	S18	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
	S19	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
	S20	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S
VIII	S02	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
IX	S17	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S
X	S12	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	S

Amicacina (AK), Cefotaxima (CT), Cefoxitina (FX), Cefalotina (CE), Clindamicina (CM), Imipenem (IP), Canamicina (KM), Minociclina (MC), Sulfametoxazol (SX), Tetraciclina (TC), Tobramicina (T), Sulfametoxazol-Trimetoprima (TS) e Ciprofloxacino (CI).
S: sensível, R: resistente.

CONCLUSÕES GERAIS

Com este estudo, foi possível identificar pontos críticos de contaminação para *Salmonella* spp em frigoríficos e açougues, além de estabelecer origens e rotas de contaminação. Com a realização das pesquisas por genes de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos, foi possível identificar isolados com a presença de diversos genes relacionados à patogenicidade e também resistentes a múltiplos antimicrobianos, reafirmando a importância deste patógeno para a saúde pública. Finalmente, com os dados completos de caracterização fenotípica e genotípica, foi possível comparar os resultados de agrupamento feito pela associação dessas ferramentas e dessa forma pode-se observar que o uso conjunto dessas técnicas pode fornecer melhores detalhes durante investigação de surtos.

ANEXOS