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

**Caracterização de determinantes de virulência, integrons classe 1 e genes
para resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella enterica*
isoladas de alimentos e fontes relacionadas**

Vinicius Buccelli Ribeiro

**Tese para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro**

**São Paulo
2007**

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

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

Caracterização de determinantes de virulência, integrons classe 1 e genes para resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas

Vinicius Buccelli Ribeiro

Tese para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro

São Paulo
2007

Vinicius Buccelli Ribeiro

Caracterização de determinantes de virulência, integrons classe 1 e genes para resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, 06 novembro de 2007.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família que sempre me apoiou e incentivou... e a Roberta, uma mulher maravilhosa e que sempre esteve ao meu lado. Obrigado por existirem...

AGRADECIMENTOS

- À professora Dr^a. Maria Teresa Destro, por me orientar na realização deste trabalho, pela amizade, respeito e paciência em momentos especiais.
- Às professoras Dr^a. Mariza Landgraf e Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco, pelo carinho e pelo apoio nestes vários anos que passei no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.
- Aos professores Dr. Luciano dos Santos Bersot e Dr. José Paes de Almeida, por fornecerem os isolados e dados pertinentes para utilização neste trabalho.
- À Fundação Oswaldo Cruz (RJ) e Instituto Adolfo Lutz (SP), pela realização da sorotipagem dos isolados.
- Aos professores Dr. Nilton Lincopan, Dr^a. Mariza Landgraf e Dr^a. Ana Terezinha Tavechio, pelas sugestões importantes e pertinentes feitas no exame de qualificação.
- Á Luci Deise Navarro pela ajuda ao sequenciar minhas amostras de DNA, sendo sempre solícita e prestativa.
- Aos colegas Ana von Laer, Nilton E. H. Lincopan, e Cristiano Andrigheto, pela parceria, colaboração, troca de experiências e, sobretudo, pela amizade.
- Às funcionárias Kátia e Lúcia, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade, convívio e pela ajuda em situações especiais.
- Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Eb, Hans, Lina, Gabriela, Cíntia, Cecília, Tatiana, Danielle, Vanessa, Paulo, Denise, Marildes, Kátia, Monika, Matheus, Giuliana, André, Keila, Ângela, Graciela, Cristina, pelo apoio, troca de experiências, amizade e momentos de descontração durante todos estes anos.
- Ao pessoal das Secretarias de FBA e de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Mônica, Cleonice, Edílson, Elaine e Jorge.

- Aos meus amigos pessoais do time do Berimball e do Mackenzie que são fundamentais na minha vida e contribuem muito para meus momentos de relaxamento e alegria.
- A todos os meus familiares, meu alicerce, que mesmo sem entenderem direito o que faço (haha), sempre me apoiaram e incentivaram durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e a CAPES, pela bolsa de mestrado durante parte do período de desenvolvimento deste trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de pesquisa.
- E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, com este trabalho – MEU MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Cepas bacterianas	16
3.2. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	18
3.3. Análise da região de determinação de resistência às quinolonas (QRDR) do gene <i>gyrA</i>	18
3.3.1 Sequenciamento dos genes <i>gyrA</i>	21
3.4. Análise do Perfil Plasmideal.....	21
3.5. Detecção de integrons classe 1.....	22
3.6. Detecção de genes de resistência a antimicrobianos.....	23
3.7. Avaliação da transferência de genes de resistência.....	25
3.8 Análise do perfil de macro-restrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	26
3.8.1 Suspensão de células de <i>Salmonella enterica</i>	27
3.8.2 Blocos de agarose (“plugs”).....	27
3.8.3 Lise bacteriana.....	27
3.8.4 Restrição e Eletroforese.....	28
3.8.5 Análise dos resultados.....	28
3.9. Detecção de genes de virulência no DNA plasmideal e cromossômico.....	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. Cepas bacterianas.....	31

4.2. Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	32
4.3. Análise da região de determinação de resistência às quinolonas (QRDR) do gene <i>gyrA</i>	38
4.4. Análise do Perfil Plasmideal.....	43
4.5. Detecção de integrons classe 1.....	45
4.6. Detecção de genes de resistência a antimicrobiano.....	47
4.7. Avaliação da transferência de genes de resistência.....	53
4.8. Análise do perfil de macro-restrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	58
4.9. Detecção de genes de virulência no DNA plasmideal e cromossômico.....	60
5. CONCLUSÕES.....	68
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Identificação, sorotipo, perfil de resistência a antimicrobianos e origem das 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> submetidas ao teste de difusão de disco.....	17
Tabela 2. Seqüências de oligonucleotídeos, produtos de PCR e temperatura de anelamento para detecção por PCR de genes de resistência a antimicrobianos de <i>Salmonella</i> sp.....	25
Tabela 3. Seqüência de oligonucleotídeos para detecção de genes de virulência de <i>Salmonella</i> sp. e seus respectivos produtos.....	31
Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) para cepas de <i>Salmonella enterica</i> frente a um painel de 14 agentes antimicrobianos.....	36
Tabela 5. Perfil de resistência a agentes antimicrobianos para cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas, submetidas ao teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e ao teste de difusão de disco.....	37
Tabela 6. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de <i>Salmonella enterica</i> resistentes às quinolonas e com sensibilidade reduzida às fluoroquinolonas, isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.....	43
Tabela 7. Resistência antimicrobiana, integrons classe 1 e perfil de genes de resistência das 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas.....	53
Tabela 8. Distribuição das 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas, conforme os nove perfis gerados pela enzima XbaI.....	56
Tabela 9. Perfil de virulência das 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Representação esquemática do preparo dos “plugs” de células de <i>Salmonella enterica</i> , restrição e eletroforese em gel de campo pulsado.....	29
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” <i>gyrA</i> para as 11 cepas de <i>Salmonella enterica</i> resistentes ao ácido nalidíxico e para a cepa de <i>S. Typhimurium</i> sensível a este antibiótico e utilizada como controle negativo.....	41
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de restrição do gene <i>gyrA</i> das 12 cepas avaliadas, após digestão com a enzima <i>BanI</i>	41
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de restrição do gene <i>gyrA</i> das 12 cepas avaliadas, após digestão com a enzima <i>Hinfl</i>	42
Figura 5. Alinhamento de uma seqüência de nucleotídeos contendo mutação no gene <i>gyrA</i> (TCC → TTC) com uma seqüência de nucleotídeos do gene <i>gyrA</i> , sem mutações, de uma cepa de <i>Salmonella Typhimurium</i> LT2.....	42
Figura 6. Perfil plasmideal das cinco cepas de <i>Salmonella enterica</i> positivas quanto à presença de plasmídeos.....	44
Figura 7. Perfil de restrição plasmideal das cinco cepas de <i>Salmonella entérica</i> multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas, utilizando-se as enzimas de restrição <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> e <i>BamHI</i>	45
Figura 8. Integrans classe 1 detectados nas cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas.....	47
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” <i>sul1</i> para as cepas de <i>Salmonella enterica</i> multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.....	48
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” <i>sul2</i> para as cepas de <i>Salmonella enterica</i> multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.....	49
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” <i>qacEΔI</i> para as cepas de <i>Salmonella enterica</i> multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.....	49

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” <i>bla_{tem}</i> para as cepas de <i>Salmonella enterica</i> multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.....	50
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” <i>aadA</i> para as cepas de <i>Salmonella enterica</i> multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.....	50
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” <i>tetA</i> para as cepas de <i>Salmonella entérica</i> Mbandaka multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.....	51
Figura 15. Perfis PFGE obtidos com as enzimas de restrição XbaI para as 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas.....	55
Figura 16. Representação da relação genética entre os nove perfis PFGE, obtidos com a enzima de restrição XbaI para as cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas.....	55
Figura 17. Experimento de conjugação bacteriana realizado entre cepas de <i>Salmonella enterica</i> multi-resistentes e uma cepa de <i>E.coli</i> K12.....	59
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” <i>sul2</i> para as cepas transconjugantes de <i>Escherichia coli</i>	59
Figura 19. Detecção do gene <i>invA</i> nas 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas, empregando-se a PCR.....	61
Figura 20. Detecção dos genes <i>sopB</i> e <i>aceK</i> nas 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas, empregando-se a Multiplex-PCR.....	61
Figura 21. Detecção do gene <i>slyA</i> nas 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas, empregando-se a PCR.....	62
Figura 22. Detecção do gene <i>h-1i</i> nas 20 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas de alimentos e fontes relacionadas, empregando-se a PCR.....	62
Figura 23. Detecção do gene <i>spvC</i> nas 5 cepas de <i>Salmonella enterica</i> isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas que apresentaram plasmídeos, empregando-se a PCR.....	63

RESUMO

Salmonella é um dos mais importantes patógenos causadores de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) no Brasil e em outros países. Devido ao surgimento de fenótipos multi-resistentes (MDR) a agentes antimicrobianos em *Salmonella*, a caracterização dos genes envolvidos neste processo, sua localização e diversidade são importantes para identificação e compreensão dos fatores envolvidos na resistência. O objetivo deste trabalho foi caracterizar determinantes genéticos de virulência, resistência e integrons classe 1 presentes em cepas de diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* multi-resistentes a antibióticos, isoladas a partir de alimentos de origem suína, avícola e fontes relacionadas. As cepas empregadas pertenceram a nove perfis PFGE distintos com a enzima XbaI, com similaridade genética variando de 38% a 68%. Integrons classe 1 foram detectados em 9 (45%) das 20 cepas de *Salmonella enterica*, incluindo cinco diferentes sorotipos: Brandenburg, Panama, Agona, Mbandaka e Alachua, e variando de 0,7Kb a 2,7Kb. Os genes de resistência *aadA*, *sul1*, *sul2*, *tetA*, *dhfr*, *qacEΔI* e *bla_{tem}*, que conferem resistência a aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina, compostos de amônio quaternário e β-lactâmicos, respectivamente, foram identificados no interior dos integrons, no cromossomo bacteriano, ou em ambos. Os genes *aadB*, *floR*, *tetB* e *tetG* não foram detectados. A resistência às quinolonas foi caracterizada nas 11 cepas que apresentaram resistência ao ácido nalidixico pela análise do gene *gyrA* e mutações Ser-83-Phe foram confirmadas após sequenciamento das amostras. Estudos de conjugação demonstraram que apenas uma cepa de *Salmonella* Mbandaka foi capaz de transferir o gene *sul2*, para uma cepa de *E. coli* K12. Com relação ao perfil de virulência, as 20 cepas de *Salmonella enterica* foram caracterizadas e os genes *slyA*, *invA*, *sopB* e *aceK* estiveram presentes em 100%

delas e o gene *h-1i* esteve presente em 18 cepas (90%). O gene *spvC* não foi detectado nas cinco cepas que possuíam plasmídeos. Os dados do presente estudo sugerem que alimentos de origem animal podem ser considerados como reservatórios de cepas de *Salmonella enterica* virulentas, resistentes a antimicrobianos e apresentando integrons classe 1. Isto caracteriza os produtos de origem suína e avícola como uma importante fonte de patógenos multi-resistentes para humanos.

Palavras-chave: *Salmonella*, alimentos, agentes antimicrobianos, multi-resistência.

ABSTRACT

Salmonella is one of the most important foodborne pathogens in Brazil and worldwide. Due to the emerging of multiresistant phenotypes in *Salmonella* the characterization of the genes involved in this process, their localization and diversity are important for identifying and understanding the factors involved in the resistance. The purpose of this study was to characterize virulence and antimicrobial determinants in different serovars of antibiotic multiresistant *Salmonella enterica* strains isolated from pork, poultry and related sources. The isolates belonged to nine different PFGE profiles obtained with XbaI restriction enzyme and showing genetic similarity ranging from 38% to 68%. Class 1 integrons were detected in 9 (45%) of 20 *S. enterica* strains ranging in size from 0,7Kb to 2,7Kb and comprising five different serotypes: Brandenburg, Panama, Agona, Mbandaka and Alachua. Resistance genes *aadA*, *qacEΔI*, *sul1*, *tetA*, *sul2*, *dhfr*, *bla_{tem1}*, that confer resistance to aminoglycosides, sulphonamides, tetracyclines, ammonium quaternary compounds and beta-lactams, respectively, were identified within class 1 integrons, chromosome, or both. Genes *aadB*, *floR*, *tetB* and *tetG* were not detected. The resistance to quinolones was characterized in 11 strains that showed resistance to nalidixic acid analyzing *gyrA* genes and Ser-83-Phe mutations were confirmed after sequencing of the samples. Conjugation studies demonstrated that only one *S. Mbandaka* strain was able to transfer *sul2* gene to the *E.coli* K12. Regarding virulence profile *Salmonella enterica* strains were characterized and PCR analysis revealed the presence of the virulence genes *invA*, *aceK*, *sopB*, *slyA* in all isolates and the presence of virulence gene *h-1i* in 18 (90%) of them. The *spvC* gene was not detected in the five strains that harbored plasmids. The data of the present study suggest that foods of animal origin can be considered reservoirs of *Salmonella*

enterica that are virulent, resistant and show class 1 integrons. This characterizes pork and poultry products as important sources of multi-resistant pathogens to human beings.

Key-words: *Salmonella*, food, antimicrobial agents, multi-resistance.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella é um dos mais importantes patógenos causadores de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA). Os microrganismos deste gênero pertencem à família *Enterobacteriaceae* e se caracterizam como bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos. São anaeróbios facultativos e a maioria é móvel (FRANCO e LANDGRAF, 1996; POPOFF e Le MINOR, 2005).

O gênero *Salmonella* é constituído pelas espécies *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie (ou espécie, no caso de *S. bongori*) ainda é subdividida em função de seu perfil antigênico. Assim, a espécie *S. bongori* agrupa 21 sorotipos e as subespécies de *S. enterica* agrupam 1504, 502, 95, 333, 72 e 13 sorotipos, respectivamente (POPOFF *et al.*, 2004).

O Center for Diseases Control and Prevention (CDC) americano sugere que, para facilitar a identificação, pode-se usar, por exemplo, *Salmonella* Enteritidis ou *S. Enteritidis* para se referir a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (BRENNER *et al.*, 2000). Neste trabalho foi utilizada esta notação.

A sorotipagem de cepas de *Salmonella* é amplamente utilizada na primeira etapa de tipagem epidemiológica deste gênero bacteriano, sendo realizada subsequentemente à determinação, por caracterização bioquímica, do gênero e espécies de *Salmonella*. Depois de realizada a sorotipagem, o principal marcador epidemiológico destas cepas, o sorotipo, passa ser conhecido (TAVECHIO, 2006). A caracterização antigênica das salmonelas é considerada importante, pois permite identificar os sorotipos circulantes e também detectar a emergência de novos sorovares em determinadas regiões (SOLARI, 1997).

Salmonella está entre as causas mais comuns de diarreia bacteriana nos diferentes países, mas sua frequência varia dependendo de fatores como hábitos alimentares, padrões de higiene no processamento de alimentos e práticas de criação animal (WHO, 1980; GIANELLA, 1981). Tanto em humanos como nos animais as infecções por *Salmonella* podem permanecer assintomáticas. Nas infecções humanas, quando as manifestações estão presentes, são reconhecidas duas formas clínicas: a febre entérica, ocasionada por *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, e a gastroenterite, que é a forma mais comum e causada pelos mais diversos sorotipos entre eles: *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Typhimurium* (D'AOUST, 1991; TOLEDO, 1991).

Diversos casos de febre entérica, desde meados da década de 1980, têm sido diagnosticados e atribuídos, principalmente, a *Salmonella Typhi*, em regiões como o sudeste asiático e a Índia, onde esta doença é encontrada de forma endêmica, entretanto essa doença ainda pode ser diagnosticada mundialmente (THRELFALL, 2002), porém com casos mais esporádicos em países desenvolvidos bem como em desenvolvimento, incluindo o Brasil (TAVECHIO *et al.*, 1996). A febre entérica humana ocorre após a colonização intestinal (geralmente, sem o desenvolvimento de diarreia), quando a bactéria atinge a circulação sanguínea desencadeando o quadro típico da doença, caracterizado por febre, torpor, cefaléia, esplenomegalia, entre outros sintomas que surgem entre 8 e 28 dias após a infecção. Antibioticoterapia é necessária para os pacientes acometidos com esta enfermidade (POPOFF e Le MINOR, 2005).

Gastroenterite (enterocolite) é a manifestação clínica da salmonelose causada por sorotipos não-tifóides e ubiqüitários. A ação da bactéria nas microvilosidades intestinais estimula a ação da adenilato ciclase provocando perda de fluidos e

eletrólitos, causando diarreia aguda. Outros sintomas clínicos da doença incluem dor abdominal, mialgia, náuseas, vômito e febre, em 8-72 horas após ingestão do alimento contaminado. Dentre os mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* já identificados até o momento (POPOFF *et al.*, 2004) apenas poucos sorotipos são potencialmente capazes de desencadear esta doença, levando-se em consideração, principalmente, a dose infectante, a virulência da cepa bacteriana e os fatores predisponentes do hospedeiro.

A salmonelose é, na maioria dos casos, auto-limitante não sendo necessária a antibioticoterapia e sua duração varia de 4 a 10 dias (POPOFF e Le MINOR, 2005). Entretanto as crianças, com seu sistema imune em desenvolvimento, os idosos, com o mesmo em progressiva degeneração, bem como os pacientes imunocomprometidos, são alvos mais suscetíveis de infecções extra-intestinais por salmonelas, e nestes casos o uso de antibióticos pode ser necessário (BUTAYE *et al.*, 2006).

Em um levantamento realizado por MEAD *et al.* (1999) nos EUA foi observada baixa mortalidade (0,78%) em indivíduos com salmonelose não-tifóide, porém a doença apresenta elevada incidência sendo responsável por mais de 1,4 milhões de casos por ano, com gastos estimados em U\$ 3 bilhões. MEAD *et al.* (1999) ainda apontam que em 95% dos casos de salmonelose não-tifóide houve transmissão por alimento.

A salmonelose humana ocorre, freqüentemente, como resultado da ingestão de água e alimentos contaminados, sendo os mais comuns: carne de aves, suínos e bovinos, ovos, leite e seus derivados (LANDGRAF *et al.*, 1985; ZHAO *et al.*, 2002; WHO, 2005).

Segundo o CDC (2005), nos EUA, durante os anos de 1998 a 2002, foram relatados 6.647 surtos de doenças de origem alimentar, sendo *Salmonella* o mais freqüente agente causador diagnosticado laboratorialmente, respondendo por 585 surtos com 16.821 pessoas afetadas e 20 mortes. Na Inglaterra no biênio 2001-2002, o microrganismo foi responsável por aproximadamente 31.000 casos de ETA, tendo sido superado apenas por *Campylobacter* (PHLS, 2002, 2003).

No Brasil, acredita-se que *Salmonella* seja a causa mais importante de infecção de origem alimentar, porém faltam dados conclusivos a respeito da real incidência deste patógeno. Analisando-se os dados mais recentemente relatados ao SIRVETA (Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos) (PANALIMENTOS, 2003), do total de 518 surtos de ETA ocorridos no país entre 1993 e 2002, 219 foram causados por este patógeno, com 10.812 pessoas afetadas.

Em São Paulo, de acordo com dados reportados pela Secretaria de Estado da Saúde, através do Boletim Epidemiológico Paulista, no período de 1999 a 2004, as bactérias foram responsáveis por aproximadamente 30% dos surtos de doenças transmitidas por água e alimentos ocorridas no estado, sendo a grande maioria destes surtos ocasionados por *Salmonella* (EDUARDO, 2005). Apesar de elevados, estes números estão aquém da realidade, uma vez que a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar é sub-relatada em nosso país e em outros países em desenvolvimento.

Assim é difícil avaliar a incidência real das salmoneloses, mas descrições de casos comprovados ligando a água e alimentos como veículos de transmissão podem ser encontrados frequentemente nesses países (LANDGRAF *et al.*, 1985; THRELFALL *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2003).

Dentre os alimentos relacionados à salmonelose se destacam salames e outros embutidos cárneos (TILDEN *et al.*, 1996). Apesar de o salame apresentar uma combinação de fatores tais como atividade de água reduzida, presença de cloreto de sódio, nitrito de sódio e pH relativamente baixo que poderia inibir a multiplicação de muitos microrganismos, deve-se considerar a possibilidade de sobrevivência de patógenos como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* no produto final, uma vez que este tipo de produto não é submetido a tratamento térmico (MOTLAGH *et al.*, 1991; MCMULLEN e STILES, 1996). Embora esses fatores combinados possam inibir a multiplicação de *Salmonella*, alguns trabalhos têm revelado que esse patógeno pode ser encontrado no produto final (REIS, 1995; MAGNANI *et al.*, 2000).

A carne suína é a principal fonte de proteínas de origem animal produzida mundialmente, conforme dados do United States Department of Agriculture – USDA, compilados por TRAMONTINI (2000), sendo a China o principal produtor. Segundo dados da Associação Brasileira de Criadores de Suínos, ABCS, estima-se que o Brasil produzirá no ano de 2007, aproximadamente, 3000 toneladas de carne suína e se mantiver a tendência dos últimos anos, 70% desta produção serão direcionados para abastecimento do mercado interno e 30% voltados para o mercado externo (ABCS, 2006).

Com a produção de suínos sob sistema de confinamento, implantado para suprir a crescente demanda mundial, surgiram inúmeros fatores que podem contribuir para maior prevalência de *Salmonella*, como a falta de higiene na granja, presença de pragas nos locais de criação, contaminação dos alimentos e água oferecidos, uso de antibióticos de amplo espectro como promotores de crescimento

e a presença de animais portadores (BERENDS *et al.*, 1996; SWANENBURG *et al.*, 2001).

A carne e derivados suínos são considerados fontes importantes de *Salmonella* em alguns países (SWANENBURG *et al.*, 2001), sendo superados apenas pelos produtos de origem avícola (HALD e WEGENER, 1999), desse modo muitos surtos de salmonelose reportados nos últimos anos têm sido atribuídos ao consumo desse tipo de alimento (MOLBAK *et al.*, 1999).

Com relação à carne de frango e seus derivados, o Brasil ocupa lugar de destaque na produção mundial tendo a avicultura brasileira registrado um crescimento importante nos últimos anos, porém apesar do aumento das exportações, 71% da produção ainda são negociados no mercado interno (ABEF, 2007).

A ocorrência e a população de *Salmonella* presente na carne de frango variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças. Apesar dos avanços tecnológicos, a carne de frango ainda é passível de contaminação bacteriana, especialmente por microorganismos do gênero *Salmonella* que se encontram albergados no trato intestinal das aves podendo vir a contaminar as carcaças, bem como outros produtos, caso o processo de abate não seja executado de modo adequado (CARVALHO e CORTEZ, 2005). No Brasil, há relatos de contaminação em frangos e seus derivados variando entre 9,2% e 86,7% (BAU, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2003; CARVALHO e CORTEZ, 2005).

As ETA têm sido nos últimos anos foco de discussões, havendo uma crescente preocupação e procura por estratégias que permitam o seu controle e,

consequentemente, a garantia da colocação de produtos seguros no mercado consumidor (MOTARJEMI e KAFERSTEIN, 1999).

A preocupação com estas enfermidades é ainda maior quando se verifica o aparecimento de bactérias, entre elas *Salmonella*, resistentes a diferentes tipos de antimicrobianos. Segundo ANDERSON (2003) esta maior resistência bacteriana pode resultar no aumento das ETA, além de dificultar o tratamento clínico das infecções devido a uma acentuada ineficiência terapêutica de tais drogas.

De acordo com o “Food and Drug Administration” (FDA, EUA) (2005), a resistência a antimicrobianos existe antes mesmo do uso dos antibióticos. A presença das drogas funciona como um mecanismo de seleção de cepas resistentes. Estudos têm demonstrado que para *Salmonella*, esse fenômeno tem assumido níveis alarmantes e o isolamento de sorotipos resistentes, inclusive aos antimicrobianos de escolha para o tratamento de humanos, vem sendo observado tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (THRELFALL *et al.*, 1993; OPLUSTIL *et al.* 2001).

A determinação do perfil de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos tem sido utilizada para monitorar o surgimento de cepas bacterianas resistentes a esses agentes, favorecendo a antibioticoterapia mais eficaz, além da subtipagem dessas cepas. Em um estudo realizado nos EUA, VARMA *et al.* (2005) constataram que a resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* não-tifóide, especialmente *S. Typhimurium*, estava estritamente associada a um aumento na frequência de bacteremias e hospitalizações entre os pacientes analisados.

O estudo da sensibilidade das bactérias aos agentes antimicrobianos pode ser realizado com diversas técnicas, entre elas, o teste de difusão de disco em agar, que é indicado para bactérias com crescimento rápido e para algumas bactérias

exigentes (CLSI, 2005a). Essas provas de difusão de disco, baseadas somente na presença ou ausência de uma zona de inibição, são aceitáveis do ponto de vista clínico, entretanto os terapeutas devem levar em consideração diversos fatores como, por exemplo, o tecido no qual está localizada a infecção, a toxicidade do antibiótico selecionado, bem como as características fisiológicas do paciente para escolher a dose adequada a ser administrada.

Outra importante técnica para o estudo da sensibilidade aos agentes antimicrobianos é a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para cada antibiótico. Esta técnica, apesar de ser mais acurada e sensível, quando comparada ao teste de difusão de disco, é mais demorada e trabalhosa, sendo, portanto, utilizada com mais freqüência em estudos epidemiológicos da sensibilidade a agentes antimicrobianos.

O surgimento de fenótipos multi-resistentes a drogas (MDR) tem sido descrito por diversos autores, principalmente entre os sorotipos de *S. Typhimurium* (THRELFALL *et al.*, 2000), *S. Newport* (CDC, 2002) e *S. Panama* (SOTO *et al.*, 2001). Algumas cepas de *Salmonella* sorotipo Typhimurium fagotipo DT104, resistentes a pelo menos cinco antimicrobianos, incluindo ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol, e tetraciclina, têm gerado infecções severas e mortes em animais e humanos, em diferentes países (CODY *et al.*, 1999). Estudos genéticos e moleculares preliminares sugerem que o completo espectro de resistência nessas cepas de *S. Typhimurium* DT 104 esteja relacionado a genes com localização cromossomal.

Apesar de não haver consenso, alguns autores consideram a ocorrência de multi-resistência decorrente do uso abusivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos como promotores do crescimento na ração animal e na profilaxia e

tratamento das salmoneloses humana e animal (WHO, 1980; THRELFALL *et al.*, 1993; TOLLEFSON *et al.*, 1997). Ainda, segundo este ponto de vista, essas práticas rotineiras acabam selecionando os microorganismos resistentes, que persistem no animal e conseqüentemente podem ser transferidos para humanos através da cadeia alimentar (ÂNGULO *et al.*, 2000).

Algumas bactérias são naturalmente resistentes a certos antibióticos (resistência intrínseca) devido ao mecanismo de ação do antibiótico ou por características estruturais da célula. A droga pode não ser absorvida pela bactéria, pode ser destruída ou ainda inativada por enzimas produzidas pelo microorganismo. A resistência pode ser também adquirida, e neste caso, as bactérias se adaptam à presença dos antimicrobianos. Essa resistência pode ser mediada por diversos mecanismos, incluindo (1) mudanças na permeabilidade da parede celular, (2) remoção dos antimicrobianos da membrana por bombas de efluxo, (3) modificação do sítio de ação da droga, e (4) destruição ou inativação dos antimicrobianos (BARBOSA e LEVY, 2000; SCHWARZ e DANCLA, 2001).

A maioria dos organismos resistentes a agentes antimicrobianos surgiu como resultado de mudanças genéticas ocorridas em seu genoma, através de mutações espontâneas nos loci cromossômicos que regulam a síntese protéica, seguidas de uma grande pressão seletiva do ambiente. A dispersão desta resistência é facilitada pela transferência vertical e horizontal desse material genético para outras bactérias durante a vida destes microrganismos resistentes (FDA, 2005).

Em muitos casos a resistência a antimicrobianos é mediada por plasmídeos, pequenas moléculas circulares de DNA extra-cromossômico, que podem ser transferidos entre bactérias por mecanismos de conjugação bacteriana. Esta transferência é bastante comum entre membros da família *Enterobacteriaceae*, o

que facilita a disseminação da característica e o surgimento de novos microorganismos resistentes (MARTINI *et al.*, 1992; SOTO *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2004).

Em relação à *Salmonella*, além dos plasmídeos de resistência conjugativos, também foram descritos plasmídeos não-conjugativos responsáveis pela resistência a uma ou mais drogas antimicrobianas (NOLAN *et al.*, 1991; RIVERA *et al.* 1991).

Os plasmídeos podem variar desde poucos até centenas de kilo-pares de bases e conter genes úteis para sua manutenção, bem como, para a célula hospedeira. Estas seqüências circulares e autônomas de DNA podem ainda conter genes que codificam resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência. Para análise do perfil plasmideal, após extração, os plasmídeos são separados por eletroforese em gel de agarose, determinando-se assim, o número e o tamanho dos mesmos. Informação adicional pode ser obtida pela digestão do DNA plasmideal com enzimas de restrição e posterior comparação do número e tamanho dos fragmentos resultantes, ou seja, análise do perfil de restrição plasmideal (HARDY, 1986).

A resistência múltipla a antimicrobianos também pode ser adquirida independente da presença de plasmídeos. Já foram descritas pequenas seqüências móveis de DNA, denominadas “integrons”, que possuem genes de resistência e que podem estar localizadas tanto no cromossomo bacteriano, como em plasmídeos, ou ainda em ambos (GUERRA *et al.*, 2001; MAGUIRE *et al.*, 2001; FDA, 2005). Assim como os plasmídeos, os integrons podem ser transferidos horizontalmente ou verticalmente.

Os elementos genéticos móveis tais como plasmídeos, transposons e os integrons, têm desempenhado um importante papel na evolução e disseminação da

multi-resistência em bactérias Gram-negativas (CARATTOLI, 2001; BROWN *et al.*, 2003).

Quatro classes de integrons já foram descritas, sendo que os de classe 1 se encontram, em sua maioria, em isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae* de origem clínica, e possuem os principais cassetes de genes de resistência a antimicrobianos (MORENO *et al.*, 2005), embora outros trabalhos já tenham identificado esses integrons, em isolados de *Salmonella* de origem alimentar (ZHAO *et al.*, 2002; CHEN *et al.*, 2004). Integrons classe 2 foram descritos em *Shigella*, com cassetes de genes que conferem resistência às sulfonamidas e estreptomicinas (PEIRANO *et al.*, 2005). Integrons classe 3 foram caracterizados em *Serratia marcescens* (ARAKAWA *et al.*, 1995) e os integrons classe 4 foram descritos apenas em *Vibrio cholerae* (MAZEL *et al.*, 1998).

Integrons classe 1 são seqüências de DNA que em sua estrutura possuem um segmento conservado 5' (5'CS) que alberga o gene integrase *int1*, o sítio de recombinação *attI1* e o promotor, geralmente seguido por uma região variável que possui um ou mais cassetes de genes de resistência a agentes antimicrobianos. Além deste segmento 5', possuem outro segmento conservado 3' (3'CS) de tamanho variável e que na maioria dos casos possui o gene *qacEΔ1*, codificando resistência a alguns anti-sépticos; o gene *sul1*, codificando resistência às sulfonamidas; e dois "open reading frames", *orf5* e *orf6* (PARTRIDGE *et al.*, 2001).

Com relação aos agentes antimicrobianos utilizados nos tratamentos de infecções causadas por bactérias patogênicas em humanos e animais, destacam-se as fluoroquinolonas e quinolonas devido seu amplo espectro de atividade antimicrobiana, potência e características farmacodinâmicas. Em bactérias

sensíveis, eles atuam inibindo as enzimas DNA girase e topoisomerase IV, que participam do processo de duplicação do DNA (PIDDOCK, 2002).

Resistência às quinolonas e fluoroquinolonas, especialmente em *Samonella* e *Campylobacter*, tem sido atribuída principalmente a mutações pontuais no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da enzima DNA girase, e com menor frequência no *gyrB*, que codifica a subunidade B desta mesma enzima (HOPKINS *et al.*, 2005). Estudos realizados nos últimos anos apontam para um aumento no surgimento de cepas de *Salmonella* resistentes a estes agentes antimicrobianos conhecidos como de escolha para o tratamento das salmoneloses em casos mais graves, causando preocupação por parte dos pesquisadores em saúde pública (AVIAL-RODRIGUEZ *et al.*, 2005; SHIRAKAWA *et al.*, 2006).

Resistência a antibióticos pode ser considerada um mecanismo adaptativo que contribui para virulência bacteriana, pois permite que a bactéria consiga persistir no hospedeiro. Genes de resistência e virulência têm como característica comum o fato de poderem estar localizados tanto no cromossomo bacteriano, como também nos plasmídeos, localizados em agrupamentos gênicos que configuram ilhas de resistência ou patogenicidade (ALONSO *et al.*, 2001; MARTINEZ e BAQUERO, 2002).

Fatores de virulência de *Salmonella* como plasmídeos, toxinas, fímbrias e flagelos têm sido objetos de estudos por décadas e são classificados agora como sendo fatores de virulência “clássicos” (van ASTEN e van DIJK, 2005). Entretanto, o conjunto dos fatores de virulência de *Salmonella* vem aumentando devido à existência de estudos minuciosos dos mecanismos moleculares da patogenicidade deste microrganismo.

Salmonella possui um sofisticado sistema de secreção de proteínas denominado “Sistema de Secreção Tipo III” (TTSS), que está envolvido diretamente nos estágios iniciais de infecção por este microrganismo (HUECK, 1999). Este sistema contribui para a patogenicidade das salmonelas por secretar e translocar diversas proteínas (proteínas efetoras) diretamente no citoplasma da célula hospedeira. Nos últimos anos algumas dessas proteínas foram identificadas (e provavelmente estejam envolvidas nesse processo), sendo um importante grupo destas proteínas efetoras conhecido como “*Salmonella* outer proteins” (Sop), que são codificadas pelos genes da família *sop* (RAHMAN *et al.*, 2006).

Segundo ROTGER e CASADESUS (1999) todos os plasmídeos de virulência de *Salmonella* possuem um locus de aproximadamente 7,8Kb que contém cinco genes de virulência designados *spv* RABCD. A expressão dos genes *spv* desempenha um papel importante na multiplicação intracelular da *Salmonella*.

A *Salmonella* é capaz ainda de produzir, durante o processo de infecção e invasão do hospedeiro, tanto endotoxinas como exotoxinas sendo que as exotoxinas podem ser divididas em dois tipos: as citotoxinas e as enterotoxinas. Entretanto, pouco se sabe sobre o modo de ação das exotoxinas de *Salmonella*. Estudos propuseram a existência de uma exotoxina, codificada pelo gene *slyA*, que seria necessária para a sobrevivência do patógeno dentro de macrófagos, denominada salmolisina (LIBBY *et al.*, 1994; O'BRIEN E HOLMES, 1996).

Outros genes importantes para a virulência de *Salmonella* são o *invA* que é o primeiro gene de um operon que codifica proteínas responsáveis pela internalização da *Salmonella* em culturas de células epiteliais (GALAN e CURTISS, 1989), o gene *h-1i* que está envolvido no controle de variação da fase flagelar de *Salmonella* (WAY *et al.*, 1993) e o gene *aceK* que codifica uma proteína bifuncional que catalisa a

fosforilação e desfosforilação de isocitrato desidrogenase (IDH) (NELSON *et al.*, 1997).

Na busca da produção de alimentos seguros à saúde do consumidor, do ponto de vista microbiológico, tem-se tentado caracterizar genotípica e fenotipicamente os isolados de origem alimentar. Um bom entendimento dos fatores que levam ao surgimento e disseminação desses patógenos na cadeia produtiva de alimentos pode ajudar no desenvolvimento de estratégias de intervenção e controle que possibilitem a redução desses microorganismos patogênicos para o homem (RASBACH *et al.*, 2001; O'BRIEN, 2002). Isto é principalmente importante quando se trata de bactérias resistentes a antimicrobianos, pois estas podem ser transferidas a humanos através da cadeia alimentar (CHEN *et al.*, 2004).

A maioria dos estudos de caracterização de genes de resistência a antimicrobianos e integrons em *Salmonella* spp., reportados durante os últimos anos, foram focados somente em isolados de origem clínica. Em nosso país, estudos sobre isolados de origem alimentar e fontes relacionadas são raros e como resultado até o momento há uma falta de dados a respeito da multi-resistência a agentes antimicrobianos e os mecanismos moleculares envolvidos tanto em *Salmonella*, quanto em outros patógenos presentes em gêneros alimentícios, o que justificou o presente estudo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar determinantes genéticos de virulência, de resistência e integrons classe 1 presentes em cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes a antibióticos isoladas a partir de alimentos de origem suína, avícola e ambiente de abate de suínos.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes frente a um painel de 14 agentes antimicrobianos
- Determinar o perfil plasmideal das cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes e analisar sua similaridade genética
- Caracterizar as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes quanto à presença de integrons classe 1
- Caracterizar os genes de resistência a antimicrobianos presentes no DNA genômico, plasmideal e integrons classe 1 das cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes
- Avaliar a capacidade de transferência de marcadores de resistência das cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes
- Analisar a similaridade genética entre as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes através da determinação do perfil de macro-restrição de DNA em campo pulsado (PFGE)
- Caracterizar as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes quanto à presença dos genes de virulência *aceK*, *h-1i*, *sopB*, *invA*, *spvC* e *slyA*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Foram utilizadas neste estudo 19 cepas de *Salmonella enterica*, resistentes a dois ou mais agentes antimicrobianos, e uma cepa sensível a todos os agentes antimicrobianos testados (controle negativo). Estas cepas foram isoladas, nos anos de 2003 e 2004, a partir de amostras de salame, suínos, frangos e ambiente de abate de suínos. Foram utilizadas como controle positivo as seguintes cepas: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13056, *Klebsiella pneumoniae* Kpbr1 (LINCOPAN *et al*, 2005), *Salmonella* Braenderup H9812 e *Escherichia coli* K12 55, F⁻, Lac⁺, Nx^r. As cepas padrão utilizadas nas diferentes metodologias estão apresentadas nos respectivos itens.

A pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizada tanto no Laboratório de Controle Microbiológico de Água e Alimentos da UFPR, Campus de Palotina, PR, seguindo as técnicas recomendadas pela APHA (American Public Health Association) e compiladas por VANDERZANT e SPLITTSTOESSER (1992) e SILVA *et al.* (1997), quanto no Laboratório de Inspeção de Alimentos da FMVZ/UNESP, Campus Botucatu, SP, segundo a metodologia preconizada por ANDREWS *et al.* (1998). Os isolados foram sorotipados no Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), RJ e no Instituto Adolfo Lutz, SP.

As cepas foram previamente submetidas ao teste de resistência a antimicrobianos, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCF-USP, pelo método de Kirby-Bauer de difusão de disco em agar Mueller Hinton (BAUER *et al.*, 1966) (Oxoid, UK), utilizando-se as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2005a). Os perfis de resistência e sorotipo das cepas, bem como sua identificação e origem estão apresentados na Tabela 1.

Após a realização do teste de resistência a antimicrobianos, as cepas foram transferidas para caldo infusão de cérebro coração (BHI) (Oxoid) e incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente, alíquotas de 0,8mL deste caldo foram transferidas para tubos de congelamento e a cada uma se adicionou 0,2mL de glicerol, sendo então congeladas a -70°C até o momento de serem novamente utilizadas.

Tabela 1. Identificação, sorotipo, perfil de resistência a antimicrobianos e origem das 20 cepas de *Salmonella enterica* submetidas ao teste de difusão de disco (KIRBY-BAUER *et al.*, 1966).

Identificação	Sorotipo	Perfil de resistência ^a	Origem
1	S. Brandenburg	NxS (Ak, Enr, K) ^b	Salame após cura
2	S. Panama	AmpCStxTeNxKS	Salame após cura
3	S. Panama	AmpCStxTeS	Salame após cura
4	S. Panama	AmpCStxTeS (K, Nx)	Salame após cura
5	S. Panama	AmpStxTeS (C, K)	Carne após moagem
6	S. Panama	AmpStxTe (S)	Carne após moagem
7	S. Agona	AmpStxTeNxS	Fezes suínas
8	S. Derby	AmpStxTeS	Fezes suínas
9	S. Derby	CStxTeNx (S)	Fezes suínas
10	S. Derby	CStxTeNx	Linfonodos
11	S. 1, 4, [5], 12:i:-	TeNxS (Amp, C)	Fezes suínas
12	S. Mbandaka	AmpCStxTe (S)	Fezes suínas
13	S. Mbandaka	AmpCStxTe (S)	Fezes suínas
14	S. Mbandaka	AmpCStxTe (S)	Fezes suínas
15	S. Mbandaka	AmpCStxTe (S)	Fezes suínas
16	S. Panama	AmpCStxTeNxS	Mesa de inspeção
17	S. Enteritidis	EnrNx (Amp, Cip, Te, Stx)	Frangos
18	S. Alachua	StxTe (Nx, Enr)	Frangos
19	S. Ouakam	CTeNxG (K, S)	Frangos
20	S. Typhimurium	Sensível ^c	Salame após cura

^a Antibióticos: amicacina (Ak), ampicilina (Amp), cloranfenicol (C), tetraciclina (Te), sulfametoxazol+trimetoprima (Stx), enrofloxacina (Enr), gentamicina (G), canamicina (K), estreptomicina (S), ácido nalidíxico (Nx) e ciprofloxacina (Cip).

^b Entre parênteses os antibióticos com valores de resistência intermediária.

^c Sensível a todos os anteriores, além de cefotaxima (Ctx), imipenem (Ipm), ceftazidima (Caz), cefoxitina (Fox) e furazolidona (Fr).

3.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM para cada cepa foi determinada pelo método de microdiluição em caldo Mueller Hinton, utilizando-se as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2005b), frente aos seguintes agentes antimicrobianos (Sigma, USA) e seus respectivos pontos de corte (concentrações limite nas quais valores superiores determinam resistência e valores inferiores sensibilidade): amicacina (Ak), 32µg/mL; ampicilina (Amp), 32µg/mL; cefotaxima (Ctx), 64µg/mL; cefoxitina (Fox), 32µg/ml; ceftazidima (Caz), 32µg/mL; ciprofloxacina (Cip), 4µg/mL; cloranfenicol (C), 32µg/mL; enrofloxacin (Enr), 2µg/mL (MALORNY *et al.*, 1999); sulfametoxazol+trimetoprima (Stx), 4µg/mL; tetraciclina (Te), 16µg/mL; gentamicina (G), 8µg/mL; canamicina (K), 25µg/mL, ácido nalidíxico (Nx), 32µg/mL e estreptomicina (S); 16µg/mL (DORAN *et al.*, 2006). Foi utilizada uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle de qualidade.

3.3 Análise da região de determinação de resistência às quinolonas (QRDR) do gene *gyrA*

As cepas que apresentaram resistência às quinolonas foram analisadas por PCR-RFLP para detecção de mutações na região de determinação de resistência às quinolonas (QRDR) do gene *gyrA*.

O DNA total foi extraído com auxílio do kit Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation (Amersham Biosciences, USA), conforme o protocolo recomendado pelo fabricante e descrito abaixo:

- **Multiplicação celular:** As cepas de *Salmonella enterica* foram transferidas para tubos contendo caldo soja tripton (TSB) (Oxoid) e mantidas a 37°C por 24 horas;

- **Lise celular:** As células foram lisadas com um detergente aniônico que solubiliza os componentes celulares, além de evitar a ação de DNase endógenas e exógenas;
- **Tratamento com RNase:** Para remover possível contaminação com RNA, fez-se um tratamento com RNase;
- **Precipitação protéica:** Proteínas citoplasmáticas e nucleares foram removidas através de precipitação por sal;
- **Precipitação do DNA:** DNA genômico foi isolado por precipitação alcoólica (isopropanol e etanol);
- **Hidratação do DNA:** O “pellet” de DNA foi dissolvido em um tampão contendo conservantes para DNA e ficou reidratando por 18 horas a temperatura ambiente.

A concentração de DNA no extrato foi determinada por espectrofotometria (A_{260nm} e A_{280nm}) conforme SAMBROOK *et al.* (1989).

O DNA das cepas que apresentaram resistência às quinolonas foi submetido à PCR para amplificação do gene *gyrA*, utilizando-se os “primers” *gyrAF*: 5'TACCGTCATAGTTATCCACG-3' e *gyrAR*: 5'GTACTTTACGCCATGAACGT-3' (HUANG *et al.*, 2004), gerando um amplicon de 315pb. As reações de PCR foram realizadas em volume total de 25 µL contendo: 100ng do DNA molde; tampão para PCR 10x [Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl] (Fermentas, USA); 1,5mM de $MgCl_2$ (Fermentas); 200µM de cada dNTP (Fermentas); 25pmol de cada “primer” e 0,5 U de Taq DNA polimerase (Fermentas). As etapas de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto; além de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos.

Alíquotas do produto amplificado foram aplicadas em gel de agarose 1% (Amersham Bioscience) em tampão TBE 0,5x (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA; pH 8,0) (SAMBROOK *et al.*, 1989), sendo realizada em seguida eletroforese, utilizando-se como marcador de peso molecular o 100bp DNA ladder (New England Biolabs, UK). Após a eletroforese o gel foi corado em solução de brometo de etídio (1µg/ml) por 20 minutos e as imagens registradas com o sistema EDAS120, sob transiluminação em UV 320nm.

Cada seqüência amplificada foi inicialmente purificada com auxílio do kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification (Amersham Biosciences), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante e resumido a seguir:

- **Desnaturação/Solubilização:** As proteínas residuais foram desnaturadas;
- **Captura do DNA:** As amostras foram submetidas à passagem por uma coluna de fibra de vidro para capturar o DNA;
- **Lavagem/Secagem:** A matriz que capturou o DNA foi lavada com um tampão a base de etanol para remover sais e outros contaminantes. Esta etapa também seca a matriz antes da eluição;
- **Eluição:** O DNA purificado foi eluído da coluna com auxílio de um tampão iônico.

Depois de purificadas, cada seqüência foi digerida individualmente com 2U das enzimas de restrição HinfI e BanI (New England Biolabs), em banho 37°C por 1:30 horas. Alíquotas do produto digerido foram aplicadas em gel de agarose 1,5% (Amersham Bioscience) em tampão TBE 0,5x, sendo este em seguida corado e fotografado conforme descrito anteriormente.

3.3.1 Sequenciamento dos genes *gyrA*

Os produtos de PCR gerados e purificados conforme o item 3.3 (antes de serem digeridos) foram submetidos ao sequenciamento do gene *gyrA*. O sequenciamento das amostras foi realizado com auxílio de um aparelho ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA), utilizando-se o kit de sequenciamento BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems). As seqüências resultantes foram alinhadas, com auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997), e comparadas com as seqüências depositadas no GenBank.

3.4 Análise do perfil plasmideal

Os possíveis plasmídeos foram extraídos com o auxílio do kit GFX Micro Plasmid Prep (Amersham Bioscience), conforme o protocolo recomendado pelo fabricante e descrito a seguir:

- **Multiplicação celular:** As cepas de *Salmonella enterica* foram transferidas para tubos contendo caldo TSB (Oxoid) e mantidas a 37°C por 24 horas;
- **Suspensão:** As células bacterianas foram suspensas em uma solução isotônica contendo Rnase;
- **Lise:** As células foram lisadas por tratamento alcalino e o DNA cromossomal e proteínas foram desnaturados;
- **Neutralização:** O pH da solução foi neutralizado com uma solução de acetato que também promove a ligação do DNA plasmideal à matriz de fibra de vidro da coluna;
- **Purificação:** Foi realizada a lavagem da coluna para remoção de proteínas residuais, carboidratos e nucleases;

- **Lavagem/Secagem:** A matriz que capturou o DNA plasmideal foi lavada com um tampão a base de etanol para remover sais e outros contaminantes. Esta etapa também permite a secagem da matriz antes da eluição;
- **Eluição:** O DNA plasmideal foi eluído da coluna com auxílio de um tampão iônico.

Após extração, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Amersham Biosciences) em TBE 0,5X para identificação das cepas que possuíam plasmídeos e determinação de seus tamanhos. Depois de identificadas, as amostras de DNA plasmideal foram submetidas à restrição individual com 5U das enzimas EcoRI, HindIII e BamHI (New England Biolabs), em banho-maria a 37°C por 1:30 horas, para se estimar a relação entre eles. Aliquotas do produto digerido foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Amersham Biosciences) em tampão TBE 0,5x, sendo em seguida corados e fotografados conforme descrito no item 3.3. O marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (New England Biolabs) foi utilizado como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos.

3.5 Detecção de integrons classe 1

Todas as amostras de DNA total e as amostras de DNA plasmideal extraídas conforme os itens 3.3 e 3.4, respectivamente, foram testadas quanto à presença de integrons classe 1, utilizando-se os "primers" 5'CS-3'CS (Forward: 5' GGCATCCAAGCAAGC-3' / Reverse: 5' AAGCAGACTTGACCTGAT-3') (LEVESQUE *et al.*, 1995). As reações de PCR foram realizadas em volume total de 50 µL contendo: 100ng do DNA molde; tampão para PCR 10x [Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl] (Fermentas, USA); 1,5mM de MgCl₂ (Fermentas); 200µM de cada dNTP

(Fermentas); 0,1µg de cada “primer” e 1 U de Taq DNA polimerase (Fermentas). As etapas de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; além de um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Como controle positivo para reação foi utilizado uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* Kpbr1 (LINCOPAN *et al.*, 2005).

Aliquotas do produto amplificado foram aplicadas em gel de agarose 1% (Amersham Biosciences) em tampão TBE 0,5x, sendo coradas e fotografadas conforme o item 3.3. O marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (New England Biolabs) foi utilizado como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos.

Os integrons classe 1 detectados após realização da reação de PCR foram purificados conforme o item 3.3 e submetidos ao sequenciamento conforme o item 3.3.1 para confirmação dos possíveis cassetes de genes inseridos em seu interior. As seqüências resultantes foram alinhadas com auxílio do programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) e comparadas com as seqüências depositadas no GenBank.

3.6 Detecção de genes de resistência a antimicrobianos

As amostras de DNA total, DNA plasmideal, bem como os produtos de PCR gerados no item 3.5 foram submetidos à purificação, conforme o item 3.3, e testados por PCR, quanto à presença dos seguintes genes de resistência a antimicrobianos: *aadA* e *aadB* – conferem resistência a aminoglicosídeos; *dhfr* – resistência a trimetoprima; *sul1* e *sul2* – resistência à sulfonamidas; *tetA*, *tetB* e *tetG* – resistência a tetraciclinas, *flo_{St}* – resistência a fenicóis, *bla_{tem}* – resistência a β-lactâmicos,

qacEΔI – resistência a compostos de amônio quaternário. Os “primers” utilizados e os tamanhos dos respectivos produtos de PCR gerados estão apresentados na Tabela 2.

As reações de PCR foram realizadas em volume total de 25 µL contendo as mesmas concentrações apresentadas no item 3.5. As etapas de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a temperatura respectiva para cada par de “primer” (Tabela 2) por 30 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; além de um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos. Aliquotas do produto amplificado foram aplicadas em gel de agarose 1% conforme o item 3.3.

Tabela 2. Seqüências de oligonucleotídeos, tamanho dos produtos de amplificação e temperatura de anelamento para detecção por PCR de genes de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* sp.

Genes	Seqüências de oligonucleotídeos	Produto (pb)	Tm (°C)	Referência
<i>aadA</i>	F: 5'GTGGATGGCGGCCTGAAGCC-3' R: 5'ATTGCCCAGTCGGCAGCG-3'	526	62	POPPE <i>et al.</i> , 2006
<i>aadB</i>	F: 5'TCCAGAACCTTGACCGAAC-3' R: 5'GCAAGACCTCAACCTTTTCC-3'	700	54	
<i>sul1</i>	F: 5'GCGCGGCGTGGGCTACCT-3' R: 5'GATTTCCGCGACACCGAGACCAA-3'	350	65	
<i>sul2</i>	F: 5'CGGCATCGTCAACATAACC-3' R: 5'GTGTGCGGATGAAGTCAG-3'	720	52	
<i>tetA</i>	F: 5'GTGAAACCCAACATACCCC-3' R: 5'GAAGGCAAGCAGGATGTAG-3'	890	53	
<i>tetG</i>	F: 5'GCTCGGTGGTATCTCTGCTC-3' R: 5'AGCAACAGAATCGGGAACAC-3'	470	57	
<i>flo_{st}</i>	F: 5'ACCCGCCCTCTGGATCAAGTCAAG-3' R: 5'CAAATCAACGGGCCACGCTGTATC-3'	550	69	
<i>bla_{tem}</i>	F: 5'CAGCGGTAAGATCCTTGAGA-3' R: 5'ACTCCCCGTCGTGTAGATAA-3'	643	53	
<i>qacEΔI</i>	F: 5'ATCGCAATAGTTGGCGAAGT-3' R: 5'GCAAGGCGGAAACCCGCGCC-3'	800	59	
<i>dhfr</i>	F: 5'TGGCTGTTGGTTGGACGC-3' R: 5'TCACCTTCCGGCTCGATGTC-3'	256	56	
<i>tetB</i>	F: 5'CTCAGTATTCCAAGCCTTTG-3' R: 5'ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG-3'	415	54	PEIRANO <i>et al.</i> , 2006

3.7 Avaliação da transferência de genes de resistência

As cepas multi-resistentes foram utilizadas como possíveis doadoras de marcadores de resistência. O experimento de conjugação foi realizado de acordo com DIAS e HOFER (1985) utilizando-se como receptora uma cepa de *Escherichia coli* K12 55, F⁻, Lac⁺, Nx^r sensível a todos os agentes antimicrobianos, exceto ácido nalidíxico (Nx).

As cepas resistentes (doadoras) e a *E. coli* K12 Nx^r (receptora) foram cultivadas em caldo BHI (Oxoid) (tubos com 20mL), sob agitação de 50rpm a 37°C por aproximadamente 2 horas (até atingir a fase exponencial). As culturas teste foram misturadas com a receptora na proporção de 1:10 e incubadas em banho-maria a 37°C por 24 horas. Após esta segunda etapa de incubação, 0,1mL das misturas foram semeados em agar MacConkey (Oxoid) contendo os antimicrobianos aos quais a cepa doadora era inicialmente resistente nas seguintes concentrações: 100µg/ml para sulfametoxazol, 50µg/ml para gentamicina e 25µg/ml para os demais agentes antimicrobianos. As cepas transconjugantes, depois de identificadas visualmente, foram submetidas ao teste de difusão de disco, de acordo com as recomendações do CLSI (2005a), considerando-se o perfil original da respectiva colônia doadora.

As bactérias transconjugantes, depois de confirmado o perfil de resistência, tiveram o seu DNA total extraído conforme o item 3.3 e foram submetidos à PCR para detecção dos possíveis genes de resistência conforme o item 3.6.

3.8 Análise do perfil de macro-restrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Para o método de PFGE foi usado o protocolo proposto pelo "The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance" (PulseNet) (CDC, 1999, 2000). As principais etapas do procedimento estão representadas na Figura 1 e descritas a seguir.

3.8.1 Suspensão de células de *Salmonella enterica*.

As cepas congeladas foram reativadas em caldo BHI (Oxoid, UK) e isoladas em TSA (Oxoid). Uma colônia isolada foi semeada em outra placa de TSA de modo a obter crescimento confluyente após 24h de incubação a 37°C. Uma porção deste crescimento foi transferida para 3mL de tampão de suspensão de células (CSB; 100mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8). Determinou-se a absorbância em 610nm (A_{610}) desta suspensão e a densidade óptica foi corrigida para 1,3 a 1,4. Uma alíquota de 200µL desta suspensão foi transferida para tubo de reação (Figura 1).

3.8.2 Blocos de agarose (“plugs”)

Ao tubo com 200µL de suspensão de células (3.8.1) foram adicionados 210µL de uma mistura de 200µg de proteinase K (Sigma), agarose para PFGE (Cambrex, USA) a 1% em tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) e 1% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). Após homogeneização, o volume total foi distribuído nos moldes reutilizáveis (BioRad, USA) para formação dos blocos (Figura 1).

3.8.3 Lise bacteriana

Após a solidificação dos “plugs” (3.8.2), os mesmos foram transferidos para tubo contendo tampão de lise celular (CLB; 50mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8, 1% sarcosil) e proteinase K (20 mg/µl) e incubados a 54°C por 2h, sob agitação (175rpm). Em seguida os “plugs” foram lavados por duas vezes com água destilada deionizada (ADD) pré-aquecida a 50°C; e outras quatro vezes com tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) também pré-aquecido a 50°C. As etapas de lavagem foram de 15 minutos cada e realizadas a 50°C, sob agitação de 175 rpm (Figura 1).

3.8.4 Restrição e Eletroforese

Uma pequena parte de cada "plug" (3.8.3) foi submetida à restrição pela enzima XbaI, de acordo com instruções do fabricante, e aplicada em gel de agarose para PFGE 1% em tampão 0,5X TBE, contendo 50µM de tiouréia para proteger o DNA bacteriano de uma possível degradação. Foi utilizado nos géis o marcador de peso molecular Lambda ladder PFG marker (New England Biolabs). A eletroforese foi realizada em uma cuba Gene Navigator (Amersham Bioscience), com os seguintes parâmetros: tempo inicial de pulso 2,2s; tempo final de pulso 63,8s; voltagem 200V (6V/cm); e tempo de corrida 18h. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 1µg/mL por 30 minutos (Figura 1). As imagens dos géis foram registradas com o sistema EDAS120, sob transiluminação em UV 320nm.

3.8.5 Análise dos resultados

Os padrões de bandas obtidos pelo método de PFGE foram comparados visualmente e as cepas agrupadas conforme seus perfis genéticos. Os pesos moleculares das bandas foram calculados com o sistema EDAS120. A correlação entre os perfis foi avaliada com auxílio do programa NTSYSpc versão 2.0, usando-se coeficiente de similaridade de Dice (DICE, 1945) e análise de "clusters" UPGMA ("Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average") (SNEATH e SOKAL, 1973)

Figura 1. Representação esquemática do preparo dos "plugs" de células de *Salmonella enterica*, restrição e eletroforese em gel de campo pulsado. TSA = Ágar soja triptona; CSB = Tampão de suspensão de células; CLB = Tampão de lise celular; TE = Tampão Tris EDTA; e SDS = Dodecil sulfato de sódio.

3.9 Detecção de genes de virulência no DNA plasmideal e cromossômico

A presença dos genes de virulência: *spvC*, *sopB*, *h-1i*, *aceK*, *slyA* e *invA*, foi avaliada através da PCR individual (este estudo) e duplex-PCR (NAYAK *et al.*, 2004), a partir do DNA plasmideal e cromossômico isolados conforme os itens 3.3 e 3.4, respectivamente. Na Tabela 3 estão apresentadas as seqüências dos “primers” que foram utilizados.

Para a reação de amplificação individual dos genes *h-1i*, *spvC*, *invA* e *slyA*, a reação foi realizada em volume total de 25µL contendo: 100ng do DNA molde; tampão para PCR 10x [Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl]; 3mM de MgCl₂; 400 µM de cada dNTP; 0,5µg de cada “primer” e 0,5 U de Taq DNA polimerase. As etapas de amplificação foram: desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto; 35 ciclos de: desnaturação a 95°C por 20 segundos, anelamento a 55°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 2 minutos; e um ciclo de extensão final a 72°C por 4 minutos. Para o duplex-PCR, os parâmetros foram os mesmos utilizados para a PCR individual, descritos acima, com exceção das concentrações finais dos “primers” na reação que foram de 0,1µM para o gene *aceK* e 2µM para o gene *sopB*. Como controle positivo foram utilizadas uma cepa de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 contendo os genes *aceK*, *invA*, *slyA*, *h-1i* e *sopB* e uma de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13056 contendo o gene *spvC*.

Alíquotas do produto amplificado foram aplicadas em gel de agarose 1%, sendo em seguida corados e fotografados conforme o item 3.3. Os marcadores de peso molecular 100bp ladder (Fermentas) e 250pb (New England Biolabs) foram utilizados como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos.

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos para detecção de genes de virulência de *Salmonella* sp. e seus respectivos produtos.

Genes	Sequência de oligonucleotídeos	Produto de PCR (pb)	Referências
<i>spvC</i>	F: 5'ACTCCTTGCACAACCAATGCGGA-3' R: 5'TGTCTTCTGCATTTCGCCACCATC-3'	571	CHIU e OU (1996)
<i>invA</i>	F: 5'TATCGCCACGTTTCGGGCA-3' R: 5'TCGCACCGTCAAAGGAACC-3'	244	
<i>slyA</i>	F: 5'GCCAAAAGTGAAGCTACAGGTG-3' R: 5'CGGCAGGTCAGCGTGTCTGTC-3'	680	SOTO <i>et al.</i> (2000)
<i>h-1i</i>	F: 5'AGCCTCGGCTACTGGTCTTG-3' R: 5'CCGCAGCAAGAGTCACCTCA-3'	173	NAYAK <i>et al.</i> (2004)
<i>aceK</i>	F: 5'CAGGGCGAGGGTATGAAACAC-3' R: 5'AACTGCGATTCTTCGGTAGAAC-3'	191	
<i>sopB</i>	F: 5'ATGCAAATACAGAGCTTCTATCA-3' R: 5'GGCATAAAGGGACAGCACA-3'	1700	

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cepas bacterianas

O interesse sobre resistência a antimicrobianos e seus respectivos problemas ocasionados tanto em medicina humana quanto veterinária tem crescido nos últimos anos. A pressão seletiva criada pelo amplo e disseminado uso de agentes antimicrobianos em animais e humanos, como agentes profiláticos e terapêuticos, respectivamente, e também como promotores de crescimento na produção animal, contribuíram, segundo alguns pesquisadores, para a disseminação de cepas bacterianas resistentes (LIEBANA *et al.*, 2002).

O isolamento de microrganismos resistentes a agentes antimicrobianos a partir de alimentos é um problema crescente em Saúde Pública, pois eles podem ser facilmente disseminados entre a população ocasionando surtos epidêmicos, especialmente se não forem adotadas medidas sanitárias adequadas (RUIZ *et al.*, 1999). Há uma reconhecida necessidade da utilização de métodos simples, rápidos

e precisos para caracterização desses isolados resistentes e para a construção de bancos de dados úteis para futuras investigações.

As 20 cepas de *Salmonella enterica* utilizadas neste estudo estiveram distribuídas entre 10 diferentes sorotipos, sendo que seis deles - Enteritidis, Typhimurium, 1,4,[5],12:i:-, Agona, Panama e Mbandaka - estiveram entre os 15 sorotipos mais prevalentes em isolados humanos durante o período de 1996-2003, no estado de São Paulo, segundo FERNANDES *et al.* (2006). Ainda segundo esses autores a maioria das amostras avaliadas foi obtida a partir de infecções gastrointestinais, fato este relacionado com o significativo aumento no número de surtos de origem alimentar ocorridos naquele período.

Os sorotipos Agona e Derby, também presentes nos isolados deste estudo, estiveram entre os 15 mais prevalentes na Europa, em 2006, de acordo com os dados reportados no programa Enter-Net (THRELFALL *et al.*, 2006). Estes dados reforçam a importância de uma caracterização genotípica e fenotípica detalhada destes sorotipos circulantes pelo Brasil e pelo mundo.

4.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas para as 20 cepas de *Salmonella enterica* frente a antimicrobianos recomendados pelo CLSI (ampicilina, ciprofloxacina, sulfametoxazol+trimetoprima, cloranfenicol e ceftazidima), além daqueles em uso (enrofloxacina) e/ou de uso proibido (tetraciclina) em prevenção/terapêutica veterinária (BRASIL, 2005a, 2005b). Empregaram-se também outros agentes, representantes de outras classes de antimicrobianos de importância para Enterobactérias (amicacina, estreptomicina, cefotaxima, cefoxitina, ácido nalidíxico, gentamicina e canamicina).

A Tabela 4 apresenta os resultados das CIM das 20 cepas de *Salmonella enterica* frente aos 14 agentes antimicrobianos testados. Todas as cepas foram sensíveis a amicacina, cefotaxima, ceftazidima, cefoxitina, ciprofloxacina e enrofloxacina. As maiores freqüências de resistência foram observadas frente à tetraciclina (85%), estreptomicina (80%), sulfametoxazol+trimetoprima (80%), ampicilina (60%), ácido nalidíxico (55%) e cloranfenicol (50%). Resistência também foi observada, porém em menor grau, frente à canamicina (20%) e gentamicina (5%).

Estudos realizados por GEBREYES *et al.* (2006) também apontam para uma maior freqüência de resistência frente à tetraciclina, estreptomicina e sulfametoxazol+trimetoprima em cepas de *Salmonella enterica* isoladas em uma indústria de processamento de suínos nos EUA. Os resultados encontrados no presente estudo também estão de acordo com ANTUNES *et al.* (2006) que reportaram em Portugal, a resistência frente à tetraciclina, estreptomicina, sulfametoxazol+trimetoprima, ampicilina e ao ácido nalidíxico, como sendo mais comuns entre cepas de *Salmonella* isoladas a partir de alimentos de origem avícola e suína.

A maior freqüência de resistência à tetraciclina (85%), observada neste estudo, foi também relatada por outros autores em alimentos e fontes relacionadas (USERA *et al.*, 2002; GEBREYES *et al.* 2004; AGUSTIN *et al.*, 2005).

As tetraciclinas compreendem uma classe de antibióticos, descobertos há mais de 50 anos, que apresentam um baixo custo e amplo espectro de atividade. Consequentemente, elas têm sido utilizadas de forma profilática e terapêutica tanto em humanos quanto em animais. A pressão seletiva exercida pelo uso das

tetraciclina, ao longo dos anos em vários ambientes, resultou no surgimento de organismos resistentes (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

Em nosso país, a tetraciclina foi amplamente utilizada como promotora de crescimento na produção animal até 1998, quando seu uso foi proibido (SILVA e DUARTE, 2002), porém ela ainda é aplicada na medicina veterinária com fins terapêuticos. Desse modo, a elevada frequência de resistência a este antibiótico era previsível e não causou surpresa.

Embora a estreptomicina não seja utilizada no tratamento das salmoneloses humanas, o teste para sensibilidade a este agente antimicrobiano é amplamente aplicado na detecção de marcadores epidemiológicos. Por exemplo, resistência à estreptomicina é associada ao fenótipo denominado de penta-resistência, observado em cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium fagotipo DT104, caracterizado pela resistência à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (AmpCSSuTe) (DORAN *et al.*, 2006). Na Tabela 5 podem ser observados perfis de resistência semelhantes a estes encontrados em *S. Typhimurium* DT104, porém entre os sorotipos Panama e Mbandaka (ID 2 a 5 e 12 a 15), indicando que estas cepas em algum momento podem ter adquirido esses genes de resistência de cepas de *S. Typhimurium* DT104.

Antimicrobianos, tais como, fluoroquinolonas (por ex. ciprofloxacina) e cefalosporinas de terceira geração (por ex. ceftriaxona) são comumente utilizados no tratamento de infecções graves por *Salmonella* em humanos. Cepas de *Salmonella* apresentando multi-resistência ou sensibilidade diminuída a estes antimicrobianos têm aumentado significativamente nas últimas décadas (THRELFALL, 2002; WEILL *et al.*, 2006)

No presente estudo foi verificado a ocorrência uma elevada porcentagem de cepas resistentes ao ácido nalidíxico (55%) e simultaneamente apresentando sensibilidade reduzida (CIM $\geq 0,125\mu\text{g/ml}$) a fluoroquinolonas (Tabela 4 – ID 1, 4, 9, 10 e 13 a 19). Especialmente no que se refere à ciprofloxacina, este fato se mostra preocupante em termos de saúde pública devido à possibilidade de falhas no tratamento de infecções gastrointestinais invasivas, quando estes agentes antimicrobianos chamados de escolha são requeridos (HOPKINS *et al.*, 2005).

Como outros pesquisadores já reportaram anteriormente e levando-se em consideração as atuais recomendações do CLSI (2005b), esses dados suportam o uso da resistência ao ácido nalidíxico como um indicador da presença de isolados de *Salmonella* sp. com sensibilidade reduzida à classe das fluoroquinolonas (HAKANEN *et al.*, 1999).

Tabela 4. Concentração inibitória mínima (CIM) para cepas de *Salmonella enterica* frente a um painel de 14 agentes antimicrobianos.

ID ^b - SOROTIPO	AGENTES ANTIMICROBIANOS ^a (µg/ml)													
	Ak	Amp	S	Te	Nx	Caz	Ctx	Cip	Enr	Fox	Stx	C	K	G
1- S. Brandenburg	8	4	32 ^c	1	512	0,25	<0,25	0,25	0,38	4	0,125	8	8	2
2- S. Panama	1	>512	128	>128	4	0,5	0,5	0,125	0,5	4	>32	256	512	0,5
3- S. Panama	2	512	128	128	16	0,25	<0,25	0,125	0,38	4	>32	256	512	1
4- S. Panama	4	512	64	128	32	0,25	<0,25	0,75	1,5	4	>32	256	256	1
5- S. Panama	4	256	64	128	16	0,25	<0,25	0,032	0,19	8	>32	128	256	2
6- S. Panama	4	32	128	128	4	0,5	<0,25	0,032	0,125	4	>32	4	4	2
7- S. Agona	4	8	512	128	8	<0,25	<0,25	0,032	0,125	4	>32	16	4	1
8- S. Derby	8	32	64	128	16	0,25	<0,25	0,047	0,19	4	>32	4	8	1
9- S. Derby	8	1	128	>128	64	0,25	<0,25	0,125	0,38	8	>32	32	4	1
10- S. Derby	4	4	8	>128	64	0,5	<0,25	0,5	1	4	>32	32	4	0,5
11- S. 1,4,[5],12:i:-	4	512	128	128	16	0,5	<0,25	0,125	0,25	4	0,25	2	2	1
12- S. Mbandaka	4	512	128	32	16	0,5	<0,25	0,125	0,09	4	>32	256	16	1
13- S. Mbandaka	4	512	128	64	32	<0,25	<0,25	0,125	0,09	8	>32	256	8	1
14- S. Mbandaka	4	512	512	64	32	0,25	<0,25	0,125	0,19	4	>32	256	4	1
15- S. Mbandaka	4	512	128	128	32	0,25	<0,25	0,125	0,19	4	>32	256	4	0,5
16- S. Panama	2	>512	512	128	32	0,5	<0,25	0,125	0,5	8	>32	16	256	1
17- S. Enteritidis	4	8	4	1	512	0,5	1	1,5	1,5	8	>32	8	2	1
18- S. Alachua	4	16	8	128	32	0,25	<0,25	0,19	0,19	4	>32	4	4	0,5
19- S. Ouakam	4	4	128	128	32	<0,25	<0,25	0,125	0,19	8	0,125	16	8	16
20- S. Typhimurium	1	4	4	2	4	<0,25	<0,25	0,047	0,38	4	0,125	2	2	0,5

^a Agentes antimicrobianos: amicacina (Ak), ampicilina (Amp), estreptomicina (S), tetraciclina (Te), ácido nalidíxico (Nx), ceftazidima (Caz), cefotaxima (Ctx), ciprofloxacina (Cip), enrofloxacina (Enr), cefoxitina (Fox), sulfametoxazol+trimetoprima (Stx), cloranfenicol (C), canamicina (K) e gentamicina (G).

^b Consultar tabela 1 para identificação da origem das cepas

^c Concentrações destacadas em vermelho referem-se a valores de resistência ao respectivo agente antimicrobiano

Tabela 5. Perfil de resistência a agentes antimicrobianos para cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas, submetidas ao teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e ao teste de difusão de disco.

ID ^b	Sorotipo	Perfil de resistência (difusão de disco) ^a	Perfil de resistência (CIM)
1	S. Brandenburg	S Nx (Ak, Enr, K) ^d	S Nx
2	S. Panama	Amp C Te Stx K S Nx	Amp C Te Stx K S
3	S. Panama	Amp C Te Stx S	Amp C Te Stx K S
4	S. Panama	Amp C Te Stx S (K, Nx)	Amp C Te Stx K S Nx
5	S. Panama	Amp Te Stx S (C, K)	Amp C Te Stx K S
6	S. Panama	Amp Te Stx (S)	Amp Te Stx S
7	S. Agona	Amp Te Stx S Nx	Te Stx S
8	S. Derby	Amp Te Stx S	Amp Te Stx S
9	S. Derby	C Te Stx Nx (S)	C Te Stx S Nx
10	S. Derby	C Te Stx Nx	C Te Stx Nx
11	S. 1,4,[5],12:i:-	Te S Nx (Amp, C)	Amp Te S
12	S. Mbandaka	Amp C Te Stx (S)	Amp C Te Stx S
13	S. Mbandaka	Amp C Te Stx (S)	Amp C Te Stx S Nx
14	S. Mbandaka	Amp C Te Stx (S)	Amp C Te Stx S Nx
15	S. Mbandaka	Amp C Te Stx (S)	Amp C Te Stx S Nx
16	S. Panama	Amp C Te Stx S Nx	Amp Te Stx K S Nx
17	S. Enteritidis	Enr Nx (Amp, Cip, Te, Stx)	Stx Nx
18	S. Alachua	Stx Te (Nx, Enr)	Te Stx Nx
19	S. Ouakam	C Te G Nx (K, S)	Te S G Nx
20	S. Typhimurium	Sensível ^c	Sensível

^a Agentes antimicrobianos: ampicilina (Amp), cloranfenicol (C), tetraciclina (Te), sulfametoxazol+trimetoprima (Stx), enrofloxacina (Enr), gentamicina (G), canamicina (K), estreptomicina (S), ácido nalidíxico (Nx).

^b Consultar tabela 1 para identificação da origem das cepas.

^c Sensível a todos os anteriores, além de amicacina (Ak), cefotaxima (Ctx), ceftazidima (Caz), cefoxitina (Fox) e ciprofloxacina (Cip).

^d Entre parênteses os antibióticos com valores de resistência intermediária

Ao analisarmos comparativamente os resultados do teste de difusão de disco e do teste de CIM (Tabela 5) podemos observar que o segundo demonstrou ser mais sensível e preciso na determinação do perfil de resistência em relação ao primeiro. Este fato pode ser observado, por exemplo, se compararmos o perfil obtido para a cepa de *S. Brandenburg* (ID 1), que no teste de difusão de disco apresentou

resistência intermediária a amicacina, enrofloxacina e canamicina, mas que no teste de CIM foi confirmada como sendo sensível.

Outro resultado importante que pode ser observado quando se compara as duas técnicas, é que algumas cepas, por exemplo, *S. Agona* (ID 7), que se mostrou resistente a determinados agentes antimicrobianos pelo teste de difusão de disco, foi sensível aos mesmos agentes pelo teste de CIM.

O mesmo foi observado para alguns agentes antimicrobianos aos quais as bactérias eram sensíveis pelo teste de difusão de disco, mas que no teste de CIM mostraram-se resistentes, como por exemplo, como no caso da cepa de *S. Alachua* (ID 18). Assim, a escolha do método a ser empregado na avaliação do perfil de resistência de isolados, tanto para estudos epidemiológicos, quanto para aplicação medicinal no tratamento clínico, deve ser feita de forma cuidadosa, levando-se em consideração alguns aspectos como custos, tempo gasto para obtenção dos resultados e facilidade de realização da técnica.

4.3 Análise da região de determinação de resistência às quinolonas (QRDR) do gene *gyrA*

Para a caracterização dos mecanismos de resistência a agentes antimicrobianos foram utilizados métodos moleculares baseados na PCR, que permitem a identificação de genes de resistência, bem como detectar sua possível localização, auxiliando na compreensão da diversidade de cepas multi-resistentes a drogas e na identificação de trocas genéticas de marcadores (GEBREYES e ALTIER, 2002).

Analisou-se o DNA total das cepas que apresentaram resistência às quinolonas, além do DNA da cepa sensível (ID 20), a fim de se detectar possíveis

mutações na região QRDR do gene *gyrA*. Mutações localizadas no códon 83 geram, segundo (GIRAUD *et al.*, 1999) sítios de restrição para a enzima *HinfI*, enquanto mutações no códon 87 geram um sítio de restrição para a enzima *BanI* (HUANG *et al.*, 2004). A técnica de PCR-RFLP, utilizando-se as enzimas de restrição *BanI* e *HinfI*, foi utilizada para detectar possíveis mutações nos codons 83 e 87 nas cepas que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e sensibilidade reduzida a fluoroquinolonas.

As 11 cepas de *Salmonella enterica* que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e susceptibilidade reduzida a ciprofloxacina (Tabela 6), mais a cepa de *S. Typhimurium* sensível ao ácido nalidíxico e utilizada como controle negativo, foram submetidas à PCR para amplificação, inicialmente, do gene *gyrA*. Os produtos de PCR, representados por uma banda de 315pb, encontram-se na Figura 2.

Após serem purificados, os genes *gyrA* foram submetidos à restrição com a enzima *BanI*, sendo que nenhuma das cepas testadas apresentou sítios de corte para esta enzima de restrição (Figura 3). Com relação à restrição com a enzima *HinfI*, foram visualizadas duas bandas de pesos moleculares de 205pb e 115pb em todas as cepas resistentes a quinolonas (Figura 4), indicando a ocorrência de uma possível mutação pontual no códon 83 (HUANG *et al.*, 2004).

Os produtos da amplificação da região QRDR do gene *gyrA* (315pb) destas amostras foram seqüenciados e se observou que as 11 amostras apresentaram a mesma mutação pontual no códon 83 do gene *gyrA*. Esta mutação é caracterizada pela substituição de uma base nitrogenada citosina por uma base timina, ocasionando a troca do aminoácido serina (TCC) por uma fenilalanina (TTC) (Figura 5).

Esses resultados estão de acordo com aqueles reportados em um trabalho de revisão realizado por HOPKINS *et al.* (2005). Aqueles autores constataram que este tipo de mutação (TCC → TTC) ocorre com maior frequência em cepas de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico.

A relação entre mutações no gene *gyrA* e resistência às quinolonas e fluoroquinolonas tem sido demonstrada em diversos estudos com bactérias Gram negativas (WEIGEL, 1998; GIRAUD *et al.*, 1999; AVIAL-RODRIGUEZ *et al.*, 2005). No presente estudo, 11 das 20 cepas de *Salmonella enterica* avaliadas foram fenotipicamente resistentes ao ácido nalidíxico sendo que todas apresentaram uma mutação pontual no códon 83 do gene *gyrA* e nenhuma mutação foi detectada no códon 87 (Tabela 6). Todas as cepas foram fenotipicamente sensíveis a ciprofloxacina e enrofloxacin. Estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados por GIRAUD *et al.* (1999) que encontraram resistência à ciprofloxacina e enrofloxacin apenas em cepas de *Salmonella* ssp. apresentando mutação tanto no códon 83 quanto no códon 87 do gene *gyrA*. Eles também verificaram que resistência ao ácido nalidíxico foi detectada apenas em cepas com mutações simples no mesmo gene.

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” *gyrA* para as 11 cepas de *Salmonella enterica* resistentes ao ácido nalidíxico e para a cepa de *S. Typhimurium* sensível a este antibiótico e utilizada como controle negativo. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 3. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de restrição do gene *gyrA* das 12 cepas avaliadas, após digestão com a enzima *BanI*. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 4. Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos produtos de restrição do gene *gyrA* das 12 cepas avaliadas, após digestão com a enzima *HinfI*. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Query	1	GAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGTATTGGGCAATG	60
Sbjct	2376235	GAGATGGCCTGAAGCCGGTACACCGTCGCGTACTTTACGCCATGAACGTATTGGGCAATG	2376176
Query	61	ACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTGCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACC	120
Sbjct	2376175	ACTGGAACAAAGCCTATAAAAAATCTGCCCGTGTGCGTTGGTGACGTAATCGGTAAATACC	2376116
Query	121	ATCCCCACGGCGATTTCGCGAGTGATGACACCATCGTTTCGTATGGCGCAGCCATTCTCGC	180
Sbjct	2376115	ATCCCCACGGCGATTTCGCGAGTGATGACACCATCGTTTCGTATGGCGCAGCCATTCTCGC	2376056
Query	181	TGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATTGACGGCGACTCCGCGG	240
Sbjct	2376055	TGCGTTACATGCTGGTGGATGGTCAGGGTAACTTCGGTTCTATTGACGGCGACTCCGCGG	2375996
Query	241	CGGCAATGCGTTATACGGAGATCCGTCTGGCGAAAAATCGCCACGAACTGATGGCCGATC	300
Sbjct	2375995	CGGCAATGCGTTATACGGAGATCCGTCTGGCGAAAAATCGCCACGAACTGATGGCCGATC	2375936
Query	301	TCGAAAAAGAGACGG	315
Sbjct	2375935	TCGAAAAAGAGACGG	2375921

Figura 5. Alinhamento de uma sequência de nucleotídeos contendo mutação no gene *gyrA* (TCC → TTC) com uma sequência de nucleotídeos do gene *gyrA*, sem mutações, de uma cepa de *Salmonella* Typhimurium LT2 (Código de acesso ao GenBank: 975KBCAH01N).

Tabela 6. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella enterica* resistentes ao ácido nalidíxico e com sensibilidade reduzida às fluoroquinolonas, isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.

ID	Sorotipo	CIM (µg/ml)			Digestão com Hinfl (pb)	Local da mutação na região QRDR
		Nx ¹	Cip ¹	Enr ¹		
1	S. Brandenburg	512	0,25	0,38	205-110	Ser-83-Fen ²
4	S. Panama	64	0,75	1,5	205-110	Ser-83-Fen
9	S. Derby	64	0,125	0,38	205-110	Ser-83-Fen
10	S. Derby	32	0,5	1	205-110	Ser-83-Fen
13	S. Mbandaka	32	0,125	0,09	205-110	Ser-83-Fen
14	S. Mbandaka	32	0,125	0,19	205-110	Ser-83-Fen
15	S. Mbandaka	32	0,125	0,19	205-110	Ser-83-Fen
16	S. Panama	32	0,125	0,5	205-110	Ser-83-Fen
17	S. Enteritidis	512	0,5	1,5	205-110	Ser-83-Fen
18	S. Alachua	32	0,19	0,19	205-110	Ser-83-Fen
19	S. Ouakam	32	0,125	0,19	205-110	Ser-83-Fen
20	S. Typhimurium	4	0,047	0,38	315	N ³

¹ Nx: ácido nalidíxico; Cip: ciprofloxacina; Enr: Enrofloxacin

² Ser-83-Fen: Substituição de um aminoácido Serina por Fenilalanina no códon 83 do gene *gyrA*

³ N: nenhuma mutação na região QRDR do gene *gyrA* (Controle negativo)

4.4 Perfil Plasmideal

Os resultados obtidos pela análise do perfil plasmideal estão apresentados na Figura 6. Do total de 20 cepas de *Salmonella enterica* utilizadas no presente estudo, 15 (75%) não apresentaram plasmídeos ("plasmid-free") sendo as cinco que os apresentavam pertencentes aos sorotipos S. Brandenburg (ID 1), S. Typhimurium (ID 20) e S. Derby (ID 8, 9 e 10).

Foram determinados três perfis plasmideais distintos, sendo o perfil 1, caracterizado por apenas um plasmídeo de 2,7Kb, encontrado na cepa de S. Brandenburg; o perfil 2, com um plasmídeo de 1,5Kb e outro com 2,7Kb, encontrado

na cepa de *S. Typhimurium* e o perfil 3, apresentando um plasmídeo de 2,3Kb e outro de 5Kb, encontrado nas três cepas de *S. Derby*.

É interessante notar que todos os plasmídeos encontrados apresentaram baixo peso molecular, não sendo observados plasmídeos de elevado peso molecular, que são característicos de cepas com conhecido potencial de virulência (por exemplo, plasmídeos de 60MDa sorotipo-específicos de *S. Typhimurium*). Entretanto LAWSON *et al.* (2004) sugere que plasmídeos de baixo peso molecular possam estar relacionados com cepas isoladas a partir de surtos de ETA.

Figura 6. Perfil plasmideal das cinco cepas de *Salmonella enterica* positivas quanto à presença de plasmídeos. M = 1Kb DNA ladder (Invitrogen); 1 – *S. Brandenburg*; 20 – *S. Typhimurium*; 8,9 e 10 – *S. Derby*.

Apesar da subtipagem das cepas de *Salmonella* pela análise do perfil plasmideal poder ser utilizada, ela apresenta limitações. A reprodutibilidade dos perfis plasmideais bacterianos é variável devido às três diferentes conformações espaciais dos plasmídeos: super-espiralado, relaxado e linear. Devido à sua conformação, plasmídeos de mesmo peso molecular podem apresentar diferentes velocidades de migração quando submetidos à eletroforese em gel de agarose (HARDY, 1986).

O perfil de restrição do DNA plasmideal é uma ferramenta adicional na caracterização de cepas bacterianas. Geralmente, plasmídeos com similaridade genética apresentam um mesmo perfil de restrição obtido com uma enzima de escolha (THRELFALL *et al.*, 1994). Os plasmídeos encontrados para as cepas de *S. Brandenburg*, *S. Typhimurium* e *S. Derby* foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI*. Os perfis de restrição encontrados foram diferentes entre os três perfis plasmideais (Figura 7), porém semelhantes entre as três cepas de sorotipo Derby, indicando uma similaridade genética entre as cepas deste sorotipo.

Figura 7. Perfil de restrição plasmideal das cinco cepas de *Salmonella entérica* multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas, utilizando-se as enzimas de restrição *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI*. M = 1Kb DNA ladder (Invitrogen); 1 – *S. Brandenburg*; 20 – *S. Typhimurium*; 8, 9 e 10 – *S. Derby*.

4.5 Detecção de integrons classe 1

Neste estudo, diversos procedimentos baseados na PCR para detecção de seqüências conhecidas do DNA, incluindo integrons, genes de resistência e virulência foram aplicados com o propósito de caracterizar os isolados de

Salmonella. A principal vantagem deste procedimento é o uso de um único equipamento, além da simplicidade, reprodutibilidade e rapidez na sua execução (del CERRO *et al.*, 2003).

Integrans classe 1 foram detectados em 9 (45%) das 20 cepas de *Salmonella enterica* utilizadas neste estudo, representando cinco sorotipos diferentes: Brandenburg, Panama, Agona, Mbandaka e Alachua, e variando de 0,7Kb a 2,7Kb (Figura 8). Estes resultados indicam que integrans classe 1, isolados a partir de cepas multi-resistentes, não estão associados, exclusivamente, a uma pequena gama de sorotipos de *Salmonella ssp.*, mas sim, amplamente disseminado entre eles.

As cepas de *S. Brandenburg* (ID 1) e *S. Mbandaka* (ID 12 a 15) apresentaram integrans classe 1, de 1700pb. As cepas de *S. Panama* (ID 5 e 6) e *S. Agona* (ID 7), apresentaram integrans classe 1 de 2700pb. Já a cepa de *S. Alachua* (ID 18) apresentou um integron classe 1, de 700pb, não descrito anteriormente, confirmando a ampla disseminação e ocorrência deste tipo de estrutura genética entre os diferentes sorotipos de *Salmonella*.

Figura 8. Integrons classe 1 detectados nas cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas. M = 1 Kb DNA ladder (Invitrogen, USA), C+ = *Klebsiella pneumoniae*, C- = Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

4.6 Detecção de genes de resistência a antimicrobianos

Entre as 20 cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes, seis genes conferindo resistência a quatro categorias de antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina e β -lactâmicos, foram identificados por PCR convencional. Com relação aos aminoglicosídeos canamicina e gentamicina e ao inibidor da via do folato (trimetoprima), além do grupo dos fenicóis, o gene responsável pela resistência não foi detectado indicando a presença de outros mecanismos de resistência ou genes associados a esse processo.

Os genes *sul1* e/ou *sul2* foram detectados em todas as cepas de *Salmonella* resistentes às sulfonamidas (Figuras 9 e 10). O gene *qacE Δ I*, que confere resistência a compostos derivados de amônio quaternário, foi detectado nas cepas de sorotipo Panama e Brandenburg que apresentaram integrons classe 1, não tendo sido detectados nas cepas de sorotipo Alachua e Mbandaka, que também possuíam

integrans (Figura 11). O gene *bla_{tem}* foi detectado em todas as cepas resistentes a ampicilina (Figura 12); o gene *aadA* foi detectado em todas as cepas resistentes a estreptomicina (Figura 13). Com relação ao gene *tetA* apenas as cepas pertencentes ao sorotipo Mbandaka, isoladas a partir de suínos, apresentaram este gene, sendo que nas outras cepas resistentes a tetraciclina não foi possível detectar o gene envolvido no processo de resistência (Figura 14). Os genes *tetB*, *dhfr*, *aadB*, *flo_{st}* e *tetG* não foram detectados nas cepas, indicando a presença de outros genes responsáveis pela resistência a alguns aminoglicosídeos, fenicóis, trimetoprima e tetraciclinas.

Figura 9. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” *sul1* para as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 10. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” *sul2* para as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), C- = Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 11. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” *qacEΔI* para as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), C- = Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 12. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” *bla_{TEM}* para as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), C- = Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” *aadA* para as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), C- = Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” *tetA* para as cepas de *Salmonella enterica* Mbandaka multi-resistentes isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas. M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas), C- = Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

A Tabela 7 apresenta a relação entre o perfil de resistência antimicrobiana, perfil de genes de resistência e presença de integrons classe 1 nos diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* utilizados neste estudo.

Depois de submetidas à PCR convencional, para detecção dos genes responsáveis pela resistência a agentes antimicrobianos, as amostras de DNA dos integrons classe 1 foram seqüenciadas para se confirmar a presença dos genes detectados. O gene de resistência antimicrobiana *sul1*, que confere resistência às sulfonamidas, foi detectado no interior dos integrons classe 1 de 1700pb (*S. Brandenburg*) e 2500pb (*S. Mbandaka*). Entretanto, embora a cepa de *S. Brandenburg* tenha apresentado esse gene, seu fenótipo não demonstrou resistência às sulfonamidas, indicando que este gene possa estar silencioso, ou seja, não apresentando um promotor associado.

Os genes *aadA* e *dhfr* foram identificados no interior dos integrons classe 1 localizados no genoma de *S. Brandenburg*, *S. Mbandaka*, *S. Panama* e *S. Agona*, confirmando a ampla disseminação destes genes associados a integrons. (ZHAO *et*

al., 2003; CHEN *et al.*, 2004; POPPE *et al.*, 2006). Os genes *sul2* e *tetA* foram identificados apenas no cromossomo bacteriano (Tabela 7), não tendo sido identificados em associação com integrons classe 1. Com relação ao gene *bla_{tem}*, este pode ser identificado tanto no cromossomo bacteriano quanto associado a integrons nas cepas resistentes a ampicilina, como no caso das cepas de *S. Panama* e *S. Agona*, demonstrando sua capacidade em se tornar funcional independentemente de sua localização ou promotor com o qual esteja associado.

Interessantemente, embora os genes *aadA* e *bla_{tem}* tenham sido identificados na cepa de *S. Typhimurium*, esta se mostrou sensível à estreptomicina e ampicilina, sugerindo que esses genes não estejam sendo expressos ou não sejam funcionais devido a falta de um promotor. ZHAO *et al.* (2001) reportaram que fenômeno similar foi encontrado em cepas de *E.coli* O111:NM e ainda demonstraram que esses genes puderam ser expressos quando transferidos para uma nova bactéria via conjugação. Portanto, embora esta cepa de *Salmonella* seja sensível à estreptomicina e ampicilina, ela pode servir como um reservatório para a disseminação dos genes *aadA* e *bla_{tem}* para outras bactérias (ZHAO *et al.*, 2003).

Outro ponto que merece destaque neste estudo foi o fato de o gene *dhfr* não ter sido detectado por PCR nas cepas estudadas, entretanto após realização do sequenciamento foi possível confirmar a presença deste gene no interior dos integrons classe 1 das cepas de *S. Mbandaka* (1700pb) e também no integron classe 1 da cepa de *S. Alachua* (700pb), confirmando ser o mais prevalente gene de resistência às trimetoprimas entre os diferentes sorotipos de *Salmonella* (HANSSON *et al.*, 2002; PEIRANO *et al.*, 2006). Estes resultados também indicam que os primers utilizados para detecção desse gene não eram adequados e/ou não possuíam homologia com o gene em questão.

Tabela 7. Resistência antimicrobiana, integrons classe 1 e perfil de genes de resistência das 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas.

ID	Sorotipo	Perfil de resistência ^a	Genes de resistência (cromossomais)	Integrons (pb) / genes de resistência inseridos
1	S. Brandenburg	SNx	-	1700/ <i>aadA</i> , <i>qacEΔI</i> , <i>sul1</i>
2	S. Panama	AmpCTeStxKS	<i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{tem}</i>	-
3	S. Panama	AmpCTeStxKS	<i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{tem}</i>	-
4	S. Panama	AmpCTeStxKSNx	<i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{tem}</i>	-
5	S. Panama	AmpCTeStxKS	<i>sul2</i>	2700/ <i>aadA</i> , <i>bla_{tem}</i> , <i>qacEΔI</i> , <i>sul1</i>
6	S. Panama	AmpTeStxS	<i>sul2</i>	2700/ <i>aadA</i> , <i>bla_{tem}</i> , <i>qacEΔI</i> , <i>sul1</i>
7	S. Agona	TeStxS	<i>sul2</i>	2700/ <i>aadA</i> , <i>bla_{tem}</i> , <i>qacEΔI</i> , <i>sul1</i>
8	S. Derby	AmpTeStxS	<i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{tem}</i>	-
9	S. Derby	CTeStxSNx	<i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul1</i>	-
10	S. Derby	CTeStxNx	<i>sul2</i> , <i>sul1</i>	-
11	S. 1,4,[5],12:i:-	AmpTeS	<i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{tem}</i>	-
12	S. Mbandaka	AmpCTeStxS	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla_{tem}</i>	1700/ <i>aadA</i> , <i>dhfr</i>
13	S. Mbandaka	AmpCTeStxSNx	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla_{tem}</i>	1700/ <i>aadA</i> , <i>dhfr</i>
14	S. Mbandaka	AmpCTeStxSNx	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla_{tem}</i>	1700/ <i>aadA</i> , <i>dhfr</i>
15	S. Mbandaka	AmpCTeStxSNx	<i>tetA</i> , <i>sul2</i> , <i>bla_{tem}</i>	1700/ <i>aadA</i> , <i>dhfr</i>
16	S. Panama	AmpTeStxKSNx	<i>aadA</i> , <i>sul2</i> , <i>sul1</i> , <i>bla_{tem}</i>	-
17	S. Enteritidis	StxNx	<i>sul2</i> , <i>sul1</i>	-
18	S. Alachua	TeStxNx	<i>sul2</i>	700/ <i>dhfr</i>
19	S. Ouakam	TeSGNx	<i>aadA</i>	-
20	S. Typhimurium	Sensível ^b	<i>aadA</i> , <i>bla_{tem}</i>	-

^a Agentes antimicrobianos: ampicilina (Amp), cloranfenicol (C), tetraciclina (Te), sulfametoxazol+trimetoprima (Stx), enrofloxacina (Enr), gentamicina (G), canamicina (K), estreptomicina (S), ácido nalidixico (Nx).

^b Sensível a todos os anteriores, além de amicacina (Ak), cefotaxima (Ctx), ceftazidima (Caz), cefoxitina (Fox) e ciprofloxacina (Cip).

4.7 Análise do perfil de macro-restrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Do total de 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas e utilizadas neste estudo, todas (100%) foram subtipáveis pela técnica

de PFGE após restrição com a enzimas XbaI. Com esta enzima foram obtidos nove perfis PFGE diferentes. Esses perfis estão apresentados na Figura 15.

Os nove perfis gerados com a enzima XbaI, apresentaram de 11 a 16 bandas, com pesos moleculares variando de 17Kb a 725Kb (Figura 15). A cada perfil de DNA gerado pela PFGE pertenceram de uma a quatro cepas e os perfis com maior número de cepas foram X2, X3 e X6, com quatro (20%) cepas. (Tabela 8).

No dendrograma apresentado na Figura 16 é possível visualizar a relação genética entre os perfis PFGE. Ao *cluster* A pertenceram seis perfis, agrupando 10 das 20 cepas estudadas. O *cluster* B foi composto por três perfis, também agrupando 10 cepas. A cepa padrão *Salmonella* Braenderup H9812 se encontra no *cluster* A.

Os *clusters* A e B apresentaram, similaridades de 38% a 68% entre os diferentes perfis PFGE. O *cluster* A pode ser subdividido em outros dois *clusters*: A1 e A2. Ao observamos o *cluster* B é possível verificar que as cepas do perfil X2 e X3, isoladas a partir de amostras de frango, apresentam 68% de similaridade entre si, a maior relação observada entre as cepas estudadas (Figura 16).

Figura 15. Perfis PFGE obtidos com as enzimas de restrição XbaI para as 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas. M = marcador de peso molecular Lambda ladder PFG marker (New England Biolabs, UK), C- = Controle negativo, C+ = *Salmonella* Braenderup H9812.

Figura 16. Representação da relação genética entre os nove perfis PFGE, obtidos com a enzima de restrição XbaI para as cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas, utilizando-se a ferramenta de análise UPGMA (SNEATH e SOKAL, 1973)

Tabela 8. Distribuição das 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas, conforme os nove perfis gerados pela enzima XbaI.

Perfil XbaI	Cepas	Sorotipo	Origem	Total
X1	1	S. Brandenburg	Salame após cura	1
X2	2, 3, 4 16	S. Panama	Salame após cura Mesa de inspeção	4
X3	5, 6 7 8	S. Panama S. Agona S. Derby	Salame após cura Fezes suínas Fezes suínas	4
X4	9 10	S. Derby	Fezes suínas Linfonodos	2
X5	11 20	S. 1,4,[5],12:i:- S. Typhimurium	Fezes suínas Salame após cura	2
X6	12, 13, 14, 15	S. Mbandaka	Fezes suínas	4
X7	17	S. Enteritidis	Frangos	1
X8	18	S. Alachua	Frangos	1
X9	19	S. Ouakam	Frangos	1

Com a análise do dendrograma, observou-se um baixo coeficiente de similaridade entre grande parte dos diferentes perfis gerados. Por exemplo, os perfis X3 e X4, agruparam cepas do sorotipo Derby, com relação genética muito pequena. A baixa similaridade entre os perfis gerados pode indicar uma origem genética distante entre as cepas estudadas.

Entretanto outro ponto que chamou atenção foi o agrupamento de cepas de um mesmo sorotipo, isoladas de diferentes locais, em um mesmo perfil PFGE, como por exemplo, o perfil X2, que agrupou cepas de S. Panama isoladas tanto de uma indústria de salame, quanto da mesa de inspeção de uma indústria de processamento de suínos. Este fato indica a possível origem em comum, a partir de

um mesmo clone, entre estas cepas que podem estar se disseminando pelo estado do Paraná.

Apesar de este estudo ter permitido para alguns sorotipos a diferenciação intersorotipo e intrasorotipo, com outros isto não ocorreu. O perfil X3, que agrupou três sorotipos distintos (Tabela 8). Esta limitação também foi observada por NAYAK *et al.* (2004) e RIBEIRO *et al.* (2007) que empregando a PFGE encontraram em um mesmo perfil de macro restrição, cepas pertencentes a sorotipos diferentes. Uma hipótese para este fato é que os resultados da sorotipagem podem ser facilmente afetados por pressões seletivas do ambiente, as quais podem influenciar na estabilidade dos traços antigênicos. Além disso, a sorotipagem é baseada na observação subjetiva da aglutinação, podendo haver a possibilidade de erro humano (DUFFY *et al.*, 2005).

Por outro lado, podemos observar que as cepas de *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- foram agrupadas em um mesmo perfil PFGE (X5), confirmando os resultados obtidos por TAVECHIO (2006). Este autor observou uma grande similaridade genética entre estes dois sorotipos, mesmo depois de realizados diversos métodos fenotípicos e genotípicos para tipagem, indicando que *S.* 1,4,[5],12:i:- é uma variante monofásica de *S.* Typhimurium.

Genes de resistência estão frequentemente localizados em elementos móveis, tais como plasmídeos e integrons, e podem assim alterar a diversidade genética de um microorganismo (POPPE *et al.*, 2006). Entretanto, a falta de relação observada entre genótipo, sorotipo e perfil de resistência nos isolados, especialmente no perfil PFGE X3, pode ter ocorrido devido à exclusão de bandas de pequeno peso molecular na análise dos perfis PFGE. Esta é uma característica limitante do método de PFGE, pois bandas de baixo peso molecular são difíceis de

terem seu tamanho estimado com os marcadores de peso molecular disponíveis para utilização nesta técnica.

4.8 Avaliação da transferência de genes de resistência

Experimentos de conjugação foram realizados para se avaliar a capacidade de transferência horizontal de integrons, genes de resistência possivelmente localizados no interior de plasmídeos e genes de resistência localizados no interior do cromossomo bacteriano entre as cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes (doadoras) e uma cepa de *Escherichia coli* K12 55, F⁻, Lac⁺ (receptora).

Os resultados encontrados neste ensaio demonstraram que apenas uma cepa de *Salmonella* Mbandaka, com perfil de resistência AmpC^rTeStxSN^rx (Tabela 5 - ID 13), foi capaz de transferir o gene *sul2* (localização cromossomal), que confere resistência às sulfonamidas, para a cepa de *E. coli* K12 (Figura 17). A presença desse gene foi confirmada por PCR nos isolados transconjugantes (Figura 18), utilizando-se os “primers” referentes ao gene *sul2* (Tabela 2). Estes resultados são semelhantes aos de ANTUNES *et al.* (2005) que encontraram cepas que *Salmonella enterica* capazes de transferir por conjugação o mesmo marcador.

É importante ressaltar que as outras cepas utilizadas neste estudo, especialmente as que possuíam integrons, estruturas genéticas conhecidas exatamente pela capacidade de transferência horizontal, não foram capazes de transferir essas estruturas se empregando esse ensaio. Estes resultados são diferentes dos apresentados em outros estudos (CHEN *et al.*, 2004; PEIRANO *et al.*, 2006) que demonstraram a capacidade de transferência de marcadores de resistência, especialmente integrons, entre diferentes cepas bacterianas. Entretanto

se deve levar em conta que a metodologia e/ou a cepa receptora empregadas foram diferentes entre estes estudos.

Figura 17. Experimento de conjugação bacteriana realizado entre cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes e uma cepa de *E.coli* K12. A – Placa controle positivo contendo agar MacConkey adicionada de ácido nalidíxico e semeadas com a cepa de *E.coli* K12. B – Placa contendo agar MacConkey adicionada de antibióticos e apresentando apenas uma cepa de *Salmonella enterica*, sem a presença de transconjugantes. C – Placa contendo agar MacConkey adicionada de sulfametoxazol e com a presença de *E. coli* K12 transconjugantes (colônias vermelhas).

Figura 18. Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, utilizando-se o “primer” *sul2* para as cepas transconjugantes de *Escherichia coli* K12. S = *Salmonella* Mbandaka (ID – 13); E = *Escherichia coli* K12 transconjugante; C- = Controle negativo; M = Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas).

4.9 Detecção de genes de virulência no DNA plasmideal e cromossômico

A presença de genes de virulência relacionados com invasão (*invA*), produção de citolisina (*slyA*), determinação de fase flagelar (*h-1i*), fosforilação e desfosforilação de IDH (*aceK*), secreção de proteínas (*sopB*) e multiplicação intracelular (*spvC*) foi determinada por PCR convencional nas cepas de *Salmonella enterica* utilizadas no presente estudo.

Na Tabela 9 estão apresentados os perfis de virulência para cada cepa de *Salmonella enterica* avaliada. Todas as 20 cepas foram positivas quanto à presença dos genes *slyA*, *aceK*, *invA* e *sopB*, ou seja, apresentaram amplicons de 244pb, 191pb, 1700pb e 680pb, respectivamente, independentemente do sorotipo a que pertenciam (Figuras 19, 20 e 21). Estes dados estão de acordo com outros estudos que comprovam a ampla disseminação destes genes entre os diferentes sorotipos de *Salmonella* (NAYAK *et al.*, 2004; RAHMAN, 2006; SKYBERG *et al.*, 2006).

Com relação ao gene *h-1i*, os ensaios de PCR utilizados neste estudo não permitiram a detecção do amplicom de 173pb em todas as cepas de *S. enterica* (Figura 22). A falta de amplicons nas cepas de *S. Panama* (ID 16) e *S. Mbandaka* (ID 15), segundo NAYAK *et al.* (2004), indica a ausência do gene ou ainda uma baixa homologia dos primers utilizados com a sequência de bases nitrogenadas deste gene. Esses autores encontraram resultados semelhantes quanto à ausência do gene *h-1i* em cepas de *Salmonella enterica* isoladas em uma produção avícola.

O gene *spvC* não foi detectado nos plasmídeos testados (Figura 23). Este resultado era esperado uma vez que não haviam sido detectados, nestas cepas, plasmídeos de elevado peso molecular que pudessem abrigar completamente o locus de 7,8Kb contendo os genes da família *spv* (ROTGER e CASADESUS, 1999).

Figura 19. Detecção do gene *invA* nas 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas, empregando-se a PCR. M: peso molecular 100pb (Fermentas). C+: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. C-: Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 20. Detecção dos genes *sopB* e *aceK* nas 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas, empregando-se a Multiplex-PCR. M1: marcador de peso molecular Supercoiled DNA ladder (Invitrogen). M2: marcador de peso molecular 100pb (Gibco). C1+: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. C-: Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 21. Detecção do gene *slyA* nas 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas, empregando-se a PCR. M: peso molecular 100pb (Gibco). C+: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. C-: Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 22. Detecção do gene *h-1i* nas 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos e fontes relacionadas, empregando-se a PCR. M: peso molecular 100pb (Fermentas). C+: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. C-: Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Figura 23. Detecção do gene *spvC* nas 5 cepas de *Salmonella enterica* isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas que apresentaram plasmídeos, empregando-se a PCR. M: peso molecular 100pb (Gibco). C+: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076. C-: Controle negativo. Consultar Tabela 5 para identificação dos sorotipos.

Tabela 9. Perfil de virulência das 20 cepas de *Salmonella enterica* isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas.

Identificação	Sorotipo	Genes de virulência					
		<i>spvC</i>	<i>slyA</i>	<i>aceK</i>	<i>invA</i>	<i>h-1i</i>	<i>sopB</i>
1	S. Brandenburg	-	+	+	+	+	+
2	S. Panama		+	+	+	+	+
3	S. Panama		+	+	+	+	+
4	S. Panama		+	+	+	+	+
5	S. Panama		+	+	+	+	+
6	S. Panama		+	+	+	+	+
7	S. Agona		+	+	+	+	+
8	S. Derby	-	+	+	+	+	+
9	S. Derby	-	+	+	+	+	+
10	S. Derby	-	+	+	+	+	+
11	S. 1,4,[5],12:i-		+	+	+	+	+
12	S. Mbandaka		+	+	+	+	+
13	S. Mbandaka		+	+	+	+	+
14	S. Mbandaka		+	+	+	+	+
15	S. Mbandaka		+	+	+	-	+
16	S. Panama		+	+	+	-	+
17	S. Enteritidis		+	+	+	+	+
18	S. Alachua		+	+	+	+	+
19	S. Ouakam		+	+	+	+	+
20	S. Typhimurium	-	+	+	+	+	+

O uso intensivo de antimicrobianos através dos anos contribuiu para seleção de alguns clones específicos, integrons e outras estruturas genéticas móveis, embora outros fatores, não diretamente relacionados com a resistência bacteriana possam ter contribuído para sua disseminação. Estudos sobre a incidência de elementos móveis, tais como integrons, podem fornecer informações importantes com relação às mudanças evolucionárias dos cassetes de genes, permitindo que estimativas sejam feitas sobre os riscos à saúde e prevenindo assim, a disseminação desses determinantes de resistência através da cadeia alimentícia chegando aos homens (ANTUNES *et al.*, 2006).

Informações de importância em Saúde Pública, resultantes de estudos com patógenos resistentes a antimicrobianos, demonstram que as circunstâncias para o surgimento e disseminação destes microrganismos são complexas e diferem por região e país. A magnitude do problema é influenciada por uma série de variáveis, tais como, práticas de uso de antibióticos em medicina humana e veterinária, controle do processo de abate animal, sistemas de armazenagem e distribuição dos alimentos, disponibilidade de água tratada e medidas apropriadas de cozimento e higiene por parte dos consumidores finais, entre outros. Embora ainda exista um desacordo entre pesquisadores quanto ao surgimento de resistência, é geralmente aceito que o uso de drogas, seja como promotor de crescimento, seja na prevenção ou tratamento, pode selecionar patógenos resistentes e estes serem transmitidos ao homem através dos alimentos (WHO, 2002; MOLBAK, 2004).

A crescente globalização no comércio de produtos alimentícios tem aumentado o risco de ocorrência de incidentes internacionais envolvendo alimentos contaminados por microorganismos e produtos químicos. Desse modo a presença de cepas de *Salmonella enterica* multi-resistentes a agentes antimicrobianos, em

alimentos de origem suína e avícola, pode contribuir de forma negativa para o processo de exportação destes produtos e vir a ocasionar imensos prejuízos econômicos para o país.

Segundo ZHAO *et al.* (2003) é essencial que agentes antimicrobianos sejam utilizados apropriadamente para que a eficácia das drogas existentes seja preservada, limitando, desse modo, o surgimento e disseminação de patógenos multi-resistentes. Há ainda a necessidade de um processo contínuo de vigilância e compartilhamento de dados a respeito da sensibilidade a antimicrobianos em bactérias isoladas a partir de alimentos e fontes relacionadas, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, para que tendências possam ser monitoradas e fenótipos de resistência emergentes identificados.

A emergência de cepas de *Salmonella* resistentes a diversos antimicrobianos deve ser particularmente observada por microbiologistas, médicos e por aqueles responsáveis pela comunicação de doenças, bem como pela indústria alimentícia. O controle da disseminação de cepas de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos é principalmente atingido através da redução do uso de tais. O correto uso de agentes antimicrobianos por produtores primários deve ser combinado com boas práticas de fabricação em todas as etapas da cadeia de produção alimentícia ("from farm to fork"). Somente com a combinação de esforços é possível tentarmos reduzir o número de cepas de *Salmonella* resistentes presentes em alimentos.

Embora estudos sobre a ocorrência de resistência a agentes antimicrobianos em bactérias estejam avançando, a magnitude do problema é totalmente desconhecida em muitos países. Esforços de colaboração internacional para implantação de processos de vigilância e avaliação de riscos devem ser implantados

nestes países. Uma saída para este problema seria a adesão ao programa “WHO’s Global *Salmonella*-Surveillance” que auxilia os países necessitados a desenvolver suas capacidades de detecção de patógenos resistentes a antimicrobianos, incluindo *Salmonella*, em humanos, animais e alimentos (WHO, 2005).

Recentemente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou um artigo contendo recomendações sobre o uso de agentes antimicrobianos de forma consciente – “Prudent Use of Antimicrobials in Food-Producing Animal” (<http://www.who.int/emc/disease/zoo/edg/draft.html>). Alguns pontos-chaves desta proposta incluem (i) a tomada de medidas efetivas por parte dos governos para reduzir a necessidade do uso de antimicrobianos em animais, (ii) vigilância no consumo de agentes antimicrobianos na produção animal e (iii) assumir, como sendo um assunto de segurança nacional, o surgimento de resistência e seu impacto em termos de saúde pública. Os governos deveriam, assim, investir esforços tanto financeiros como científicos visando ampliar o conhecimento sobre este assunto (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

Os dados apresentados no presente estudo sugerem que alimentos de origem animal podem ser considerados como reservatórios de cepas de *Salmonella enterica* virulentas, resistentes a antimicrobianos e apresentando integrons classe 1, caracterizando a cadeia alimentícia, especialmente, produtos de origem suína e avícola, uma possível fonte de disseminação de patógenos multi-resistentes para humanos.

Diante dos resultados obtidos, torna-se claro o potencial risco que essas cepas podem representar para a saúde da população consumidora, não devendo, portanto, serem medidos esforços para que decisões efetivas sejam tomadas pelas indústrias e pelas autoridades da vigilância sanitária. Estes devem atuar com uma

maior e mais eficiente fiscalização buscando diminuir a presença de cepas de *Salmonella* multi-resistentes a antimicrobianos em produtos de origem suína e avícola.

5. Conclusões

- As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas, confirmando a multi-resistência a agentes antimicrobianos entre as cepas de *Salmonella enterica* utilizadas neste estudo.
- Os diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* não apresentaram perfis plasmideais geneticamente semelhantes.
- As cepas de sorotipo Brandenburg, Agona, Derby, Mbandaka e Alachua apresentaram integrons classe 1, demonstrando a ampla disseminação destas estruturas genéticas entre os diferentes sorotipos de *Salmonella*.
- Os genes *sul1*, *sul2*, *qacEΔI*, *aadA*, *dhfr*, *tetA* e *bla_{tem}* responsáveis pela resistência a diversos grupos de agentes antimicrobianos foram detectados nos integrons e cromossomos das cepas de *Salmonella enterica* utilizadas neste estudo.
- Apenas uma cepa de *Salmonella* Mbandaka foi hábil em transferir o marco de resistência a sulfonamidas por conjugação bacteriana.
- Através da tipagem por PFGE, observou-se nove perfis genéticos pouco relacionados entre si, indicando origens genéticas distintas para algumas cepas e também evidenciando a presença de possíveis clones entre as cepas estudadas.
- Todas as cepas de *Salmonella enterica* utilizadas neste estudo apresentaram os genes *aceK*, *slyA*, *sopB* e *invA* enquanto o gene *h-1i* foi detectado em 90% das cepas, demonstrando o potencial de virulência destas cepas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUSTIN, A.I.; CARRAMINANA, J.J.; ROTA, C.; HERRERA, A. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. from pigs at slaughter in Spain in 1993 and 2001. **Letters in Applied Microbiology**, v.41, n.1, p.39-44, 2005.

ALMEIDA, I.C. *et al.* Isolamento e identificação de *Salmonella* em carcaças de frango congeladas e frescas, através de método rápido. **Higiene Alimentar**, v.14, n.110, p.74-79, 2003.

ALONSO, A.; SANCHEZ, P.; MARTINEZ, J.L. Environmental selection of antibiotic resistance genes. **Environmental Microbiology**, v. 3, p.1-9, 2001.

ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHAFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.17, p.3389-402, 1997.

ANDERSON, A.D.; NELSON, J.M.; ROSSITER, S.; ANGULO, F.J. Public health consequences of use of antimicrobial agents in food animals in the United States. **Microbial Drug Resistance**, v.9, n.4, p.373-79, 2003.

ANDREWS, W.H.; JUNE, G.A.; SHERROD, P.S.; HAMMAK, T.S.; AMAGUANA, R.M. *Salmonella*. In: Food and Drug Administration. **Bacteriological analytical manual**: Revision A. 8th ed. AOAC International, p.5001-5020, 1998.

ÂNGULO, F.J.; JOHNSON, K.R.; TAUXE, R.V.; COHEN, M.L. Origins and consequences of antimicrobial resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. **Microbial Drug Resistance**, v.6, p.77-83, 2000.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L. Dissemination of sulfonamide resistance genes (sul1, sul2, and sul3) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.2, p.836-9, 2005.

ANTUNES, P.; MACHADO, J.; PEIXE, L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.2, p.297-304, 2006.

ARAKAWA, Y.; MURAKAMI, M.; SUZUKI, K.; ITO, H.; WATCHAROTAYAN, R.; OHSOKA, S.; KATO, N.; OHTA, M. A novel integron-like element carrying the

metallo- β -lactamase gene bla_{imp}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1612-1215, 1995.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO – ABEF. Disponível em: www.abef.com.br. Acesso em: 30/03/2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE SUÍNOS – ABCS. Disponível em: www.abcs.com.br. Acesso em: 30/03/2007.

AVIAL-RODRIGUEZ, I.; AVIAL-RODRIGUES, C.; LÓPEZ, O.; PICAZI, J.J. Trends in nalidixic acid resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolated from 1999 to 2002: decreased susceptibility to 6 fluoroquinolones. **Diagnostic Microbiology and Infect Disease**, v.52, p.261-64, 2005.

BARBOSA, T.M. and LEVY, S.B. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. **Drug Resistance Update**, v.3, p.303-311, 2000.

BAU, A.C. *et al.* *Salmonella* em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas-RS. **Higiene Alimentar**, v.13, n.60, p.26, 1999.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n.4, p.493-6, 1966.

BERENDS, B.R; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A.; VAN KNAPEN, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, n.1-2, p.37-53, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SisLegis - Sistema de Consulta a Legislação. **Instrução Normativa n.9, de 27 de junho de 2003**. Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1398>. (Acesso em: 20/12/2005a).

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SisLegis - Sistema de Consulta a Legislação. **Portaria n.193, de 12 de maio de 1998**. Aprova o Regulamento Técnico para o licenciamento e a renovação de licença de antimicrobianos de uso veterinário, anexo, elaborado pela Secretaria de Defesa Agropecuária. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1125>. (Acesso em: 20/12/2005b).

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

BROWN, D.J.; MTHER, H.; BROWNING, L. *et al.* Investigation of human infections with *Salmonella enterica* serovar Java in Scotland and possible association with imported poultry. **Euro Surveillance**, v.8, p.35-40, 2003.

BUTAYE, P.; MICHAEL, G.B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T.J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D.G. The clonal spread of multidrug-resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**, v.8, p.1891-97, 2006.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Veterinary Research**, v.32, p.243-59, 2001.

CARVALHO, A.C.F.B.; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. Em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiça e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1465-68. 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Salmonella* serotype Typhimurium by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **PulseNet: The national molecular subtyping network for foodborne disease surveillance**. Atlanta: Centers for Disease Control, Section 5.2, p.1, 1999.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **PulseNet: The national molecular subtyping network for foodborne disease surveillance**. Atlanta: Centers for Disease Control, Section 5.11, p.1-14, 2000

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illness - selected sites, United States, 2001. **MMWR**, v.51, n.15, p.325-329, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5115a3.htm> (Acesso em 17/03/2002)

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary FoodNet data on the incidence of infections with pathogens transmitted commonly through food - 10 sites, United States, 2004. **MMWR**, v.54, n.14, p.352-356, 2005. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5414a2.htm> (Acesso em 17/08/2005)

CHEN, S.; ZHAO, S.; WHITE, D.G.; SCHROEDER, C.M.; LU, R.; YANG, H.; MCDERMOTT, P.F.; AYERS, S.; MENG, J. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. **Applied and Environmental Microbiology**, v.70, p.1-7, 2004.

CHIU, C.; OU, J.T. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC* by an enrichment broth culture-multiplex PCR combination assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2619-2622, 1996.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v.65, n.2, p.232-60, 2001.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana. Sexta edição. **CLSI documento M07-A06**, v.23, n.2, 2005a.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. 15th suplemento informativo. **CLSI documento M100-S15**, v.25, n.1, 2005b.

CODY, S.H.; ABBOT, S.L.; MARFIN, A.A.; SCHULZ, B.; WAGNER, P.; ROBBINS, K.; BOETANI, J.C.; VUGIA, D.J. Two outbreaks of multidrug resistance *Salmonella* Typhimurium dt104 infections linked to raw-milk cheese in California. **Journal of the American Medical Association**, p.1805-1810, 1999.

D'AOUST, J.Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v.13, p.207-216, 1991.

Del CERRO, A.; SOTO, S.M.; MENDOZA, M.C. Virulence and antimicrobial-resistance gene profile determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. **Food Microbiology**, v.20, p.431-438, 2003.

DIAS, J.C.A.R. e HOFER, E. Bactérias Gram negativas resistentes a antimicrobianos em alimentos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.80, n.4, p.411-421, 1985.

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

DORAN, G.; NICHULAIN, M.; DELAPPE, N.; O'HARE, C.; CORBETT-FEENEY, G.; CORMICAN, M. Interpreting streptomycin susceptibility test results for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.27, n.6, p.538-40, 2006.

DUFFY, E.A.; LUCIA, L.M.; KELLS, J.M.; CASTILLO, A.; PILLAI, S.D.; ACUFF, G.R. Concentrations of *Escherichia coli* and genetic diversity and antibiotic resistance profiling of *Salmonella* isolated from irrigation water, packing shed equipment, and fresh produce in Texas. **Journal Food Protection**, v.68, n.1, p.70-9, 2005.

EDUARDO, M.B.P. Doença diarreica e outras relacionadas à transmissão hídrica e alimentar – aspectos programáticos, metodológicos e situação epidemiológica, São Paulo, agosto de 2005. **BEPA, coordenadoria de Controle de Doenças (CCD)**, p. 2-11, 2005.

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

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Judicious use of antimicrobials for swine veterinarians, 2005. Disponível em: www.fda.gov/cvm/Documents/JUSWINE.pdf (Acesso em: 17/08/2005).

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. Atheneu: São Paulo, p.182, 1996.

GALAN, J.E.; CURTISS I.I.I., R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *S. Typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, U.S.A. 86, p. 6383-6387, 1989.

GEBREYES, W.A.; ALTIER, C. Molecular characterization of multiple-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 2813-2822, 2002.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; DAVIES, P.R.; FUNK, J.A.; ALTIER, C. Trends in antimicrobial resistance, phage types and integrons among *Salmonella* serotypes from pigs, 1997-2000. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.6, p.997-1003, 2004.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; MORROW, W.E. Comparison of prevalence, antimicrobial resistance, and occurrence of multidrug-resistant *Salmonella* in antimicrobial-free and conventional pig production. **Journal Food Protection**, v.69, n.4, p.743-8, 2006.

GIANELLA, R.A. Pathogenesis of acute bacterial diarrhea disorders. **Annual Reviews of Medicine**, v.32, p. 341-347, 1981.

GIRAUD, E.; BRISABOIS, A.; MARTEL, J.L.; CHASLUS-DANCLA, E. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.9, p.2131-7, 1999.

GUERRA, B.; SOTO, S.; ARGUELLES, J.M.S.; MENDONZA, C. Multidrug resistance is mediated by large plasmids carrying a class 1 integrons in the emergent *Salmonella enterica* serotypes [4,5,12:i-]. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1305-8, 2001.

HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; JALAVA, J.; SIITONEN, A.; HUOVINEN, P. Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella* and validation of nalidixic acid screening test. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.11, p.3572-7, 1999.

HALD, T.; WEGENER, H. Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: International Symposium of epidemiology and control of *Salmonella* and other foodborne pathogens in pork, 3th. Washington D.C., 1999. **Proceedings**. Washington, p.200-205, 1999.

HANSSON, K.; SUNDSTROM, L.; PELLETIER, A. *Int2* integron integrase in Tn7. **Journal of Bacteriology**, v.184, p.1712-21, 2002.

HARDY, K. Bacterial Plasmids. Biogen SA, Geneva, Switzerland. **American Society for Microbiology**, 2^a ed., p.114, 1986.

HOPKINS, K.L.; DAVIES, R.H.; THRELFALL, E.J. Mechanisms of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.358-73, 2005.

HUANG, T.M.; CHANG, Y.F.; CHANG, C.F. Detection of mutations in the *gyrA* gene and class I integron from quinolone-resistant *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, v.100, n.3-4, p.247-54, 2004.

HUECK, C.J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 379-433, 1999.

LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J.A.; FALCÃO, D.P. Surto de toxinfecção alimentar por *Salmonella Bredeney*. **Caderno de Saúde Pública**, v.19, p.92-3, 1985.

LAWSON, A.J.; STANLEY, J.; THRELFALL, E.J.; DESAI, M. Fluorescent amplified fragment length polymorphism subtyping of multiresistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.10, p.4843-5, 2004.

LEVESQUE C, PICHE L, LAROSE C, ROY PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, n.1, p.185-91, 1995.

LIBBY, S.J.; GOEBEL, W.; LUDWIG, A.; BUCHMEIER, N.; BOWE, F.; FANG, F.C.; GUINEY, D.G.; SONGER, J.G.; HEFFRON, F. A cytolysin encoded by *Salmonella* is required for survival within macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.489-493, 1994.

LIEBANA, E.; CLOUTING, C.; CASSAR, C.A.; RANDALL, L.P.; WALKER, R.A.; THRELFALL, E.J.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; RIDLEY, A.M.; DAVIES, R.H. Comparison of *gyrA* mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1481-6, 2002.

LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V.C.; GALES, A.C.; MAMIZUKA, E.M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.1, p.516-9, 2005.

MAGNANI, A.L.; GIOMBELLI, A.; SHUCK, M.S.; BUSATO, M.A.; SILVA, N.L. Incidência de *Salmonella* e *Escherichia coli* em carne suína in natura e salame colonial, consumidos pela população de Chapecó - SC. **Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.44-47, 2000.

MAGUIRE, A.J.; BROWN, D.F.J.; GRAY, J.J.; DESSELBERGER, U. Rapid screening technique for class 1 integron in *Enterobacteriaceae* and non fermenting gram-negative bacteria and its use in molecular epidemiology. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1022-1029, 2001.

MALORNY, B.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.9, p.2278-82, 1999.

MARTINEZ, J. L.; BAQUERO, F. Interaction among strategies associated with bacterial infection pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. **Clinical and Microbiology Reviews**, v.15, p.647-679, 2002.

MARTINI, A.; FILETICI, E.; FANTASIA, M. Epidemiology markers of *Salmonella* Typhimurium isolates in Rome. **Journal of Medical Microbiology**, v.37, p.104-08, 1992.

MAZEL, D.; DYCHINCO, B.; WEBB, V.A.; DAVIES, J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. **Science**, v.280, p.605-608, 1998.

MCMULLEN, L.M.; STILES, M.E. Potential for use of bacteriocin producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **Journal Food Protection**, p.64-71, 1996.

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

MOLBAK, K.; BAGGESEN, D.L.; AARESTRUP, F.M.; EBBESEN, J.M.; ENGBERG, J.; FRYDENDAHL, K.; GERNER-SMIDT, P.; PETERSEN, A.M.; WEGENER, H.C. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **New England Journal of Medicine**, v.341, n.19, p.1420-5, 1999.

MOLBAK, K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans--the public health consequences. **Infection Disease**, v.51, n.8-9, p.364-9, Review, 2004.

MORENO, M.O.P.; PONT, M.C.; BAIGES, A.M.J.; LOMBARTE, M.I.L.; GANDUXÉ, X.T.; LOPEZ, J.Z. Integrones de clase 1 em aislados de *Salmonella enterica* productores de diferentes tipos de betalactamasas recogidos em la región sanitaria de Tortosa. **Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica**, v.23, n.5, p. 259-65, 2005.

MOTARJEMI, Y; KAUFERSTEIN, F. Food safety, hazard analysis and critical control point and the increase in foodborne disease: a paradox? **Food Control**, v.10, p.325-33, 1999.

MOTLAGH, A.M.; JOHNSON, M.C.; RAY, B. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. **Journal Food Protection**, v.54, n.11, p. 873-884, 1991.

NAYAK, R.; STEWART, T.; WANG, R.F.; LIN, J.; CERNIGLIA, C.E.; KENNEY, P.B. Genetic diversity and virulence genes determinants of antibiotic-resistant *Salmonella*

isolated from preharvest turkey production source. **International Journal of Food Microbiology**, v.90, p.51-62, 2004.

NELSON, K.; WANG, F.S.; BOYD, E.F.; SELANDER, R.K. Size and sequence polymorphism in the isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase gene (*aceK*) and flanking regions in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. **Genetics**, v.147, p.1509-1520, 1997.

NOLAN, L.K.; WOOLEY, R.E.; BROWN, J.; PAYER, J.B. Comparison of phenotypic characteristics of *Salmonella* spp. Isolated from healthy and ill chickens. **American Journal of Veterinary Research**, v.52, n.9, p.1512-17, 1991.

O'BRIEN, A.D.; HOLMES, R.K. Protein toxins of *E. coli* and *Salmonella*. **American Society for Microbiology**, p.2788-2802, 1996.

O'BRIEN, T.F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increased resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clinical Infection Disease**, v.34, p.78-84, 2002.

OPLUSTIL, C.P.; NUNES, R.; MENDES, C. RESISTNET Group. Multicenter evaluation of resistance Patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.5, n.1, p.8-12, 2001.

PANALIMENTOS. **SIRVETA**. Disponível em:
http://www.panalimentos.org/sirveta/e/report_eta01.asp. (Acesso em: 17/03/07).

PARTRIDGE, S.R.; RECCHIA, G.D.; STOKES, H.W. *et al.* Family of class 1 integrons related to *Int1* from Tn1696. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.3014-20, 2001.

PEIRANO, G.; AGERSO, Y.; AARESTRUP, F.M.; RODRIGUEZ, D. Occurrence of integrons and resistance genes among sulphonamide-resistant *Shigella* spp. from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, n.3, p.301-5, 2005.

PEIRANO, G.; AGERSO, Y.; AARESTRUP, F.M.; RODRIGUES D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, n.2, p.305-9, 2006.

PIDDOCK, L.J. Fluoroquinolones resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animal. **Federation of European Microbiological Societies**, v.26, p.3-16, 2002.

POPPE, C.; MARTIN, L.; MUCKLE, A.; ARCHAMBAULT, M.; MCEWEN, S.; WEIR, E. Characterization of antimicrobial resistance of *Salmonella* Newport isolated from animals, the environment, and animal food products in Canada. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.70, n.2, p.105-14, 2006.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research Microbiology**, v.155, n.7, p.568-570, 2004.

POPOFF, M.Y.; Le MINOR, L.E. The genus *Salmonella*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Editors). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2^a ed.; vol.2, Springer, NY, USA, p.764-99, 2005.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SYSTEM. **Communicable Disease Report**, v.12, n.2, 2002. Disponível em:
<http://www.phls.org.uk/publications/cdr/PDFfiles/2002/cdr0202.pdf> (Acesso em 17/03/03)

PUBLIC HEALTH LABORATORY SYSTEM. **Communicable Disease Report**, v.13, n.2, 2003. Disponível em:
<http://www.phls.org.uk/publications/cdr/archive03/News/news0203.htm> (Acesso em 17/03/03).

RAHMAN, H. Prevalence & phenotypic expression of *sopB* gene among clinical isolates of *Salmonella enterica* **Indian Journal of Medical Research**, v.123, p.83-88, 2006.

RASBACH, W.; TSCHAPE, H.; BAUMLER, A.J. Nontyphoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v.3, p.237-247. 2001

REIS, R.B.; KRUGER, C.S.; MACIEL, M.S. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, v.15, n.1, p.74-78, 1995.

RIBEIRO, V.B.; ANDRIGHETO, C.; BERSOT, L.S.; BARCELLOS, V.; REIS, E.F.; DESTRO, M.T. Serological and genetic diversity amongst *Salmonella* strains isolated in a salami processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, n.1, p.178-182, 2007.

RIVERA, M.J.; RIVERA, N.; CASTILLO, J.; RUBIO, M. C.; GOMEZ-LUS, R. Molecular and epidemiological study of *Salmonella* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.5, p.927-32, 1991.

ROTGER, R.; CASADESUS, J. The virulence plasmid of *Salmonella*. **International Microbiology**, v.2, p.177-184, 1999.

RUIZ, J.; CAPITANO, L.; NUNEZ, L.; CASTRO, D.; SIERRA, J.M.; HATHA, M.; BORREGO, J.J.; VILA, J. Mechanisms of resistance to ampicillin, chloramphenicol and quinolones in multiresistant *Salmonella* Typhimurium strains isolated from fish. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, n.5, p.699-702, 1999.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T., eds. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2^a ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3, 1989.

SCHWARS, S. and CHASLUS-DANCLA. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v.32, p.201-225. 2001.

SHIRAKAWA, T.; ACHARYA, B.; KINOSHITA, S.; KUMAGAI, S.; GOTOH, A.; KAWABATA, M. Decreased susceptibility to fluoroquinolones and *gyrA* gene mutation in the *Salmonella enterica* serovar Typhi and Paratyphi A isolated in Katmandu, Nepal in 2003. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.54, p.299-303, 2006.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. Ed. Varela, p.295, 1997.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.4, n.2, p.85-100, 2002.

SKYBERG, J.A., LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex-PCR. **Avian Disease**, v.50, n.1, p.77-81, 2006.

SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. San Francisco: Freeman, p.573, 1973.

SOLARI, C. A. Caracterização dos sorovares de *Salmonella* isolados em aves de diferentes estados no quinquênio 1992-1996. In: **XIX Congresso Brasileiro de Microbiologia**. RJ, 1997. Anais, p.126.

SOTO, S.M.; MARTINEZ, N.; GUERRA, B.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDONZA, M.C. Usefulness of genetic typing methods to trace epidemiologically *Salmonella* serotype Ohio. **Epidemiology and Infection**, v.125, p.481-489, 2000.

SOTO, S.M.; GUERRA, B.; CERRO, A.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDONZA, M.C. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA

fingerprinting and antimicrobial resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.35-43, 2001.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A.; KEUZENKAMP, D.A.; van KNAPEN, F. *Salmonella* in the lairage of pig slaughterhouses. **Journal Food Protection**, v.64, n.1, p.12-16, 2001.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO K. Changing patter of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.5, p.327-34, 1996.

TAVECHIO, A.T. Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo 1,4,[5], 12:i:- e de *Salmonella Typhimurium*. Tese apresentada para obtenção do título de doutor. **Instituto Adolf Lutz**, p. 27-28. 2006.

THREFALL, E.J.; ROWE, B.; WARD, L.R. A comparison of multiple drug resistance in salmonelas from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. **Epidemiology and Infections**, v.111, p.189-197, 1993.

THRELFALL, E.J., HAMPTON, M.D.; CHART, H.; ROWE, B. Use of plasmid profile typing for surveillance of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from humans, poultry and eggs. **Epidemiology and Infections**, v.112, n.1, p.25-31, 1994.

THREFALL, E.J. Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT 104-a truly international multiresistence clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, p.7-10, 2000.

THREFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **Federation of European Microbiological Societies Reviews**, v.26, p.141-8, 2002.

THREFALL, E.J.; REILLY, B.; GILL, N. International surveillance network for the enteric infections – *Salmonella*, VTEC O157 and *Campylobacter*. 2006. Available in: www.hpa.org.uk/hpa/inter/enter-net_menu.htm . (Acesso em: 30/03/2007).

TILDEN J.J.R.; YOUNG, W.; MCNAMARA, A.M.; CUSTER, C.; BOESEL, B.; LAMBERT-FAIR, M.A.; MAJKOWSKI, J.; VUGIA, D.; WERNER, S.B.; HOLLINGSWORTH, J.; MORRIS, J.G.J.R. A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. **American Journal of Public Health**, v.86, n.8, p.1142-1145, 1996.

TOLEDO, M.R.F. *Salmonella-Shigella*. In: TRABULSI, L.R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p.157-160, 1991.

TOLLEFSON, L.; ALTEKRUSE, S.F.; POTTER, M.E. Therapeutic antibiotics in animal feeds and antibiotic resistance. **Revue Scientifique et Technique**, v.16, p.709-715, 1997.

TRAMONTINI, P.; Consumo da carne suína: a experiência brasileira. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 2000, São Paulo, SP. **Anais**, p.06-11, 2000.

USERA, M.A.; ALADUENA, A.; GONZALEZ, R.; DE LA FUENTE, M.; GARCIA-PENA, J.; FRIAS, N.; ECHEITA, M.A. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. **Journal Food Protection**, v.65, n.5, p.768-73, 2002.

van ASTEN, A.J.A.M.; van DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **Federation of European Microbiological Societies Reviews**, v.44, p.251-259, 2005.

VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of food**. American Public Health Association, 1992.

VARMA, JK; MOLBAK, K; BARRET, TJ; BEEBE, JL; JONES, TF, RABATSKY-HER, T. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. **Journal of Infection Disease**, v.191, p.554-61, 2005.

WAY, J.S.; JOSEPHSON, K.L.; PILLAI, S.D.; GERBA, C.P.; PEPPER, I.L. Specific detection of *Salmonella* spp. by multiplex PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, p.1473-79, 1993.

WEIGEL, L.M.; STEWARD, C.D.; TENOVER, F.C. *gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance in eight species of *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, n.10, p.2661-7, 1998.

WEILL, F.X.; BERTRAND, S.; GUESNIER, F.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A.; GRIMONT, P.A. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky in travelers. **Emerging Infection Disease**, v.12, n.10, p.1611-2, 2006.

WHO Scientific Working Group. Enteric infections due to *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella* and *Shigella*. **Bulletin of the World Health Organization**, v.58, p.519-37, 1980.

World Health Organization (WHO). Monitoring antimicrobial usage in food animals for the protection of human health. **Report of a WHO consultation** Oslo, Norway, 10 to 13 September 2001, 2002. Disponível em:

http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_EPH_2002_11/en/. (Acesso em: 30/3/2007).

World Health Organization (WHO). Drug-resistant *Salmonella*. **Fact sheet nº139**. Revisado em Abril de 2005. Disponível em [http:// www.who.int/mediacentre/factsheet /fs139/en](http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs139/en) (Acesso em 10/12/2006)

ZHAO, S.; WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F.; FRIEDMAN, S.; ENGLISH, L.; AYERS, S.; MENG, J.; MAURER, J.J.; HOLLAND, R.; WALKER, R.D. Identification and expression of cephamycinase bla(CMY) genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and ground meat. **Applied and Environmental Microbiology**, v.67, p.1558-64, 2001.

ZHAO, S.; DATTA, A.R.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; WALKER, R.D.; WHITE, D. G. Antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from imported foods. **International Journal of Food Protection**, v. 84, p.87-92, 2002.

ZHAO, S.; QAIYUMI, S.; FRIEDMAN, S.; SINGH, R.; FOLEY, S.L.; WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F.; DONKAR, T.; BOLIN, C.; MUNRO, S.; BARON, E.J.; WALKER, R.D. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.12, p.5366-71, 2003.