

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

Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em
cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou
não à toxinfecções alimentares

Ruth Estela Gravato Rowlands

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2008

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

Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em
cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou
não à toxinfecções alimentares

Ruth Estela Gravato Rowlands

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

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

São Paulo
2008

Ruth Estela Gravato Rowlands

Perfil de susceptibilidade antimicrobiana e genes de virulência em cepas de
Salmonella spp. isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções
alimentares

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco
orientador/presidente

Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto
1º. examinador

Dra. Roxane Maria Fontes Piazza
2º. examinador

São Paulo, 12 de junho de 2008.

Dedicatória

Aos meus pais, João e Aparecida, pelo amor, carinho, dedicação, apoio, incentivo e pelas lições de vida.

Ao meu marido, Alexandre, pelo amor, paciência, apoio, compreensão e por sempre estar ao meu lado.

Aos meus irmãos, Rosângela e João Roberto, pelo apoio, carinho e momentos agradáveis.

Aos meus sobrinhos, Matheus e João Victor, que trouxeram mais alegria para nossas vidas.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Bernadette D. G. Melo Franco pela oportunidade, confiança, orientação, ensinamentos e estímulo para realização deste trabalho.

À Diretoria do Instituto Adolfo Lutz, em especial à Deise Aparecida Pinatti Marsiglia, Diretora do Serviço de Alimentos, pelo apoio e incentivo.

À Dra. Miyoko Jakabi pelos preciosos ensinamentos, pelas oportunidades que contribuíram para o meu amadurecimento profissional e pessoal, pelo incentivo, pelo apoio nos momentos difíceis e, sobretudo, pela amizade.

À Christiane A. R. Costa pela amizade, pela parceria, pela compreensão, pelo incentivo, pela troca de experiências, pelos conselhos e pelo apoio nos momentos especiais.

À Dra. Maria Luisa Barbosa pela amizade, pelas valiosas sugestões e críticas, pelos ensinamentos, pelas palavras de sabedoria, pelo apoio e incentivo.

Às pesquisadoras Dra. Vera Cecília Annes Ferreira e Alice Akimi Ikuno pela oportunidade de realização da pesquisa dos genes de virulência no Laboratório de Imunologia do Instituto Biológico, pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pelas orientações e a atenção dispensada.

À Dra. Rosemeire Cobo Zanella, pesquisadora da Seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pelas sugestões e orientação na execução dos testes de sensibilidade antimicrobiana.

A Dra. Miyoko Jakabi, Profa. Dra. Maria Teresa Destro e Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto pelas sugestões e correções feitas no exame de qualificação.

Aos colegas, funcionários e estagiários da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, em especial à Júlia T. Utiyama Yoshida, sempre solícita e prestativa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
SUMÁRIO	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Gênero <i>Salmonella</i>	3
2.2 Epidemiologia.....	5
2.3 Patogenicidade e fatores de virulência.....	8
2.4 Resistência antimicrobiana.....	11
2.5 Mecanismos de resistência antimicrobiana.....	17
2.6 Mecanismos de disseminação de resistência antimicrobiana.....	19
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Cepas de <i>Salmonella</i> spp.	23
4.2 Pesquisa dos genes de virulência.....	30
4.2.1 Extração do DNA genômico.....	30
4.2.2 <i>Primers</i>	31
4.2.3 Amplificação do DNA extraído.....	32

4.3 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.....	33
4.4 Análise Estatística.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Cepas de <i>Salmonella</i>	35
5.2 Pesquisa dos genes de virulência.....	41
5.3 Perfil de susceptibilidade antimicrobiana.....	53
6. CONCLUSÕES.....	75
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Distribuição das cepas de <i>Salmonella</i> , nas diferentes categorias de alimento, associadas à toxinfecções alimentres.....	37
FIGURA 2. Distribuição das cepas de <i>Salmonella</i> , nas diferentes categorias de alimento, não associadas à toxinfecções alimentres.....	37
FIGURA 3. Distribuição do número de cepas analisadas e que apresentaram resistência de acordo com o ano de isolamento.....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Identificação e origem das cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de alimentos associados à toxinfecções alimentares.....	24
Tabela 2. Identificação e origem das cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de alimentos não associados à toxinfecções alimentares.....	25
Tabela 3. Seqüência de oligonucleotídeos utilizados como <i>primers</i> na PCR simplex e PCR multiplex.....	31
Tabela 4. Histórico de 18 surtos envolvendo as cepas de <i>Salmonella</i> caracterizadas no presente estudo.....	39
Tabela 5. Distribuição dos genes de virulência entre as cepas de <i>Salmonella</i> associadas à toxinfecções alimentares.....	42
Tabela 6. Distribuição dos genes de virulência entre as cepas de <i>Salmonella</i> não associadas à toxinfecções alimentares.....	43
Tabela 7. Prevalência dos genes <i>spvC</i> , <i>sefA</i> e <i>pefA</i> entre os sorovares de <i>Salmonella</i> isolados de alimentos associados à toxinfecções alimentares.....	52
Tabela 8. Prevalência dos genes <i>spvC</i> , <i>sefA</i> e <i>pefA</i> entre os sorovares de <i>Salmonella</i> isolados de alimentos não associados à toxinfecções alimentares.....	52
Tabela 9. Perfil de virulência das cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis associadas ou não à toxinfecções alimentares.....	53

Tabela 10. Perfil de resistência antimicrobiana em <i>Salmonella</i> spp. isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares.....	56
Tabela 11. Perfil de resistência antimicrobiana entre os diferentes sorovares de <i>Salmonella</i> isolados de alimentos associados à toxinfecções alimentares.....	57
Tabela 12. Perfil de resistência antimicrobiana entre os diferentes sorovares de <i>Salmonella</i> isolados de alimentos não associados à toxinfecções alimentares.....	58
Tabela 13. Número e porcentagem de cepas resistentes isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares.....	64
Tabela 14. Frequência (%) de resistência aos 15 antimicrobianos avaliados de acordo com o ano de isolamento das cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	72

RESUMO

Salmonella é o agente etiológico mais comumente envolvido em casos e surtos de doenças diarréicas de origem alimentar no Brasil e outros países. A preocupação com este patógeno é, ainda, maior quando se verifica o surgimento e disseminação de cepas multi-resistentes e potencialmente mais patogênicas. O presente estudo teve como objetivo caracterizar 237 cepas *Salmonella* spp. distribuídas entre 50 sorovares diferentes, isoladas de alimentos associados e não associados à toxinfecções alimentares, quanto ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana e presença dos genes de virulência *spvC*, *invA*, *sefA* e *pefA*. O gene *invA* foi detectado em todas as cepas de *Salmonella*. Com relação aos demais genes estudados, *spvC* e *pefA* foram encontrados em 48,1% e 44,3% das cepas, respectivamente. O gene *sefA* foi detectado em 31,6% das cepas, estando presente somente entre as cepas de *S. Enteritidis*. Ainda com relação à presença dos genes de virulência, as cepas de *S. Enteritidis* foram classificadas em três perfis, com predominância (90,7%) do perfil constituído pelos quatro genes de virulência. Quanto ao perfil de susceptibilidade antimicrobiana, 46,8% do total de cepas avaliadas foram sensíveis a todos os agentes antimicrobianos, 51,9% resistentes à pelo menos uma droga e 1,3% das cepas apresentaram apenas resistência intermediária. Multi-resistência foi observada em 10,5% das cepas. As maiores taxas de resistência foram observadas para estreptomicina (35,9%), ácido nalídixico (16,9%), tetraciclina (5,9%) e gentamicina (4,6%). Não foram detectadas cepas resistentes à cefoxitina, cefalotina, cefotaxima, amicacina, ciprofloxacina e imipenem. Os resultados do presente estudo mostram a

ampla distribuição dos genes de virulência e ocorrência de resistência antimicrobiana tanto nas cepas associadas a surtos como naquelas não envolvidas em toxinfecções alimentares, sendo os produtos de origem avícola fontes importantes de *Salmonella* com estas características.

Palavras chave: *Salmonella*. Resistência antimicrobiana. Genes de virulência. Toxinfecções alimentares.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance profile and virulence genes in *Salmonella* spp. strains isolated from foods associated and non-associated to foodborne disease outbreaks

Salmonella is the most common causative agent of cases and outbreaks of foodborne diarrhoeal diseases in Brazil and other countries. The concern with this pathogen is even greater considering the emergence and spread of multi-resistant and potentially more pathogenic strains. In this study, the antimicrobial susceptibility profile and the presence of virulence genes *spvC*, *invA*, *sefA* and *pefA* were examined in 237 *Salmonella* strains belonging to 50 serovars, isolated from foods associated and non-associated to foodborne disease outbreaks. The gene *invA* was detected in all *Salmonella* strains. The genes *spvC* and *pefA* were found in 48.1% and 44.3% of strains, respectively. The *sefA* gene was found in 31.6% of strains and detected only in *S. Enteritidis* strains. According to the presence of virulence genes, *S. Enteritidis* strains were grouped into three profiles, being the one consisting of four virulence genes the most common profile (90.7%). Among strains, 46.8% were sensitive to all antibiotics, 51.9% resistant to at least one drug and 1.3% of the strains presented intermediate resistance. Multi-resistance was seen in 10.5% of the strains. The highest rates of resistance were observed for streptomycin (35.9%), nalidixic acid (16.9%), tetracycline (5.9%) and gentamicin (4.6%). No resistance was observed to cefoxitin, cephalothin, cefotaxime, amikacin, ciprofloxacin and imipenem. The results of this study show the wide distribution of virulence genes and occurrence of antimicrobial resistance in strains

both associated and non-associated to foodborne disease outbreaks, being poultry products the major sources of *Salmonella* with these characteristics.

Key-words: *Salmonella*. Antimicrobial resistance. Virulence genes. Foodborne disease outbreak

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) representam um importante e crescente problema para a Saúde Pública, gerando prejuízos sociais e econômicos. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2005, foram reportados 1,8 milhões de óbitos devido a doenças diarréicas, com uma grande proporção dos casos atribuída ao consumo de água e alimentos contaminados (WHO, 2007). Nos Estados Unidos, onde o monitoramento das DTA é eficiente, estima-se que alimentos contaminados causem 76 milhões de casos de doença, 325 mil hospitalizações e cinco mil mortes por ano (MEAD et al., 1999). O custo das DTA nos EUA está estimado entre 5 e 6 bilhões de dólares em gastos diretos e perda de produtividade.

No Brasil, foram notificados, no período de 1999 a 2007, 5.699 surtos de DTA envolvendo 114.302 casos e 61 óbitos (SVS, 2007). Segundo o Sistema de Informações Hospitalares, os custos com os casos internados por essas enfermidades, entre 1999 a 2004, chegaram a 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano. Esses números são certamente inferiores aos reais, pois pouco se conhece sobre a magnitude do problema, já que a maioria dos casos não é notificada (SVS, 2005). No Estado de São Paulo, no período de 2000 a 2005, foram notificados 1411 surtos de diarreia, com 51.112 casos. Dentre os surtos, 80% estavam relacionados com o consumo de alimentos contaminados e quase 10% à água (CVE, 2006).

Mundialmente, *Salmonella* é o agente etiológico mais comumente envolvido em casos e surtos de doenças diarréicas de origem alimentar. Na União Européia foram notificados, em 2004, 192.703 casos de salmonelose (EFSA, 2006). Nos Estados

Unidos, em 2005, foram confirmados laboratorialmente 16.614 casos de DTA, sendo que *Salmonella* foi o agente etiológico isolado com maior frequência, em 38,9% dos casos (CDC, 2006).

No Brasil, entre os 2.834 surtos elucidados no período de 1999 a 2007, 85% foram causados por bactérias, sendo *Salmonella* responsável por 1.331 (47%) surtos (SVS, 2007). No Estado de São Paulo foram notificados, entre 1999 e 2003, ao Centro de Vigilância Epidemiológica, 1.024 surtos de diarreia, envolvendo 27.499 casos. Dos 459 surtos com etiologia identificada, 325 (70,8%) foram causados por bactérias, sendo 140 (43,1%) por *Salmonella*, com 3.001 pacientes afetados (EDUARDO *et al*, 2004).

A preocupação com as DTA é, ainda, maior quando se verifica o aparecimento de bactérias, entre as quais *Salmonella*, resistentes a diferentes drogas antimicrobianas. O surgimento e disseminação de microrganismos resistentes podem resultar no aumento das DTA, assim como dificultar o tratamento clínico das infecções devido à ineficiência terapêutica (ANDERSON *et al.*, 2003; MOLBAK, 2005). A resistência antimicrobiana pode, ainda, estar associada com o aumento da virulência de *Salmonella* (MOLBAK, 2005), uma vez que o risco de infecções sistêmicas e hospitalizações em pacientes infectados com *Salmonella* não-tifóides resistentes, particularmente *S. Typhimurium*, é mais elevado (VARMA *et al*, 2005).

A virulência de *Salmonella* está relacionada com genes presentes no cromossomo e em plasmídeos. O genoma dos plasmídeos determina grande parte das diferenças na patogenicidade entre os sorovares e as cepas (FLUIT, 2005). A aquisição de novos elementos genéticos pode tornar a bactéria mais adaptada a um determinado ambiente ou espécie hospedeira, tornando-a potencialmente mais patogênica (FOLEY E LYNNE, 2008).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Salmonella*

As bactérias do gênero *Salmonella*, família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram-negativos, não formadoras de esporos, usualmente móveis com flagelos peritríquios (exceto *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*) e anaeróbias facultativas. Fermentam a glicose, produzindo ácido e gás, porém são, geralmente, incapazes de metabolizar a lactose e sacarose. São oxidase negativas e catalase positivas, utilizam o citrato como única fonte de carbono, descarboxilam a lisina e ornitina e não hidrolisam a uréia (LE MINOR, 1984)

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A primeira é constituída por 6 subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (POPOFF *et al*, 2004). Recentemente foi proposta a inclusão de uma terceira espécie denominada *subterranea* (SHELOBOLINA, 2004), ainda não reconhecida taxonomicamente. Atualmente são conhecidos 2541 sorovares, com ampla disseminação na natureza (POPOFF *et al*, 2004).

Os sorovares da subespécie *enterica* podem ser nomeados de acordo com a síndrome com a qual estão relacionados (*S. Typhi*), com o hospedeiro (*S. Cholerasuis*) ou com a região onde foram isolados pela primeira vez (*S. Dublin*) (FORSHELL e WIERUP, 2006). Para os sorovares das demais subespécies e para *S. bongori* são utilizadas fórmulas antigênicas de acordo com o esquema Kauffmann-White (POPOFF *et al*, 2004).

A maioria dos sorovares responsáveis por causar enfermidades, no homem e nos animais, está contida na espécie *enterica* subsp. *enterica*. Em humanos, as salmonelas são responsáveis por três síndromes:

a) Febre tifóide: doença bacteriana aguda, de gravidade variável, causada por *S. Typhi*, sendo transmitida por água e alimentos contaminados unicamente com material fecal humano. Os sintomas aparecem, em geral, dentro de 14 dias e são caracterizados por septicemia, febre alta, diarreia, vômitos, letargia, dor abdominal, cefaléia e erupções cutâneas, com duração de uma a oito semanas e taxa de letalidade em torno de 10%. Alguns indivíduos podem se tornar portadores, excretando a bactéria durante meses (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

b) Febre paratifóide: causada pela *S. Paratyphi A* e *C*. A doença é semelhante à febre tifóide, mas com sintomas mais brandos. Geralmente ocorre septicemia, febre, vômitos e diarreia, com duração máxima de três semanas (JAY, 2005);

c) Salmonelose (gastrenterite ou enterocolite): representa a forma clínica mais comum e tem como agentes etiológicos os sorovares não tifóides e ubíquos. Os sintomas aparecem em 12 a 36 horas após o consumo de alimentos contaminados e caracterizam-se por febre, cefaléia, calafrios, dor abdominal, diarreia, náuseas e vômito (JAY, 2005). A dose infectante varia de acordo com as condições do hospedeiro, do sorovar e do alimento envolvido, podendo estar entre 20 e 10^6 células (FORSYTHE, 2002). As salmoneloses podem ser severas, especialmente em crianças, idosos e imunodeprimidos (VARNAM e EVANS, 1991), uma vez que a bactéria pode atingir a corrente sangüínea e provocar infecções extra-intestinais que incluem septicemia, eritema nodoso, meningite, osteomielite, pneumonia e outras (D'AOUST e MAURER, 2007).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Salmonella está amplamente distribuída na natureza, tendo como habitat primário o trato intestinal de mamíferos, anfíbios, répteis, aves e insetos. As infecções por *Salmonella* ocorrem após a ingestão de água e alimentos contaminados com o patógeno. Embora diversos alimentos estejam envolvidos na sua transmissão ao homem, destacam-se os produtos de origem animal como os ovos, as carnes de aves, bovinas e suínas e o leite, assim como os seus derivados (JAY, 2005).

Levantamentos epidemiológicos, realizados em diversas regiões do Brasil, confirmam a importância destes produtos como os principais veiculadores de *Salmonella* em surtos de DTA, principalmente a carne de aves e os ovos (JAKABI et al, 1999; ALMEIDA et al, 2000; TAVECHIO et al. 2002; NADVORNY et al., 2004). A conservação em temperatura inadequada, o consumo de produtos crus ou mal cozidos e a contaminação cruzada entre produtos crus e alimentos processados são os principais fatores que contribuem para a ocorrência das DTA (FORSYTHE, 2002).

A persistência e disseminação de *Salmonella* e outros patógenos entéricos na produção animal está relacionada, principalmente, com a presença de animais portadores e com o fornecimento de água e ração contaminados (DOYLE e ERICKSON, 2006). Sistemas de criação intensivos, operações de abate e processamento das carcaças também contribuem para a disseminação e multiplicação de bactérias patogênicas (BESSA et al, 2007; ARTHUR et al., 2004; FRANCHIN et al, 2005). Com relação aos ovos, a contaminação pode ocorrer durante ou após a postura, com penetração do patógeno pela casca ou durante a sua formação no oviduto das aves (transmissão transovariana) (DE BUCK et al, 2004).

No Brasil há uma grande variação na prevalência de *Salmonella* em carne de aves e derivados. Estudos realizados em diferentes regiões do país mostraram freqüências entre 7% e 50% em carcaças de frango (RISTORI, 2007; TIROLLI e COSTA, 2006; CARVALHO e CORTEZ, 2005; VESSONI, 2004; SANTOS et al., 2000; FUZIHARA et al., 2000), entre 10,48% e 30% em cortes comerciais de frango (BAU et al., 2001; CARVALHO e CORTEZ, 2005), de 16% em lingüiça (CARVALHO e CORTEZ, 2005), 3,24% em salsicha (LUIZ et al., 2004) e 25% carne mecanicamente separada de aves (CARVALHO e CORTEZ, 2005).

A freqüência e o nível de contaminação em carcaças podem variar, dependendo das condições climáticas, do transporte dos animais, condições do curral e de processamento (HOBBS e ROBERTS, 1999; CARVALHO e CORTEZ, 2005). Além disso, a metodologia empregada para pesquisa do microrganismo também pode estar relacionada com as diferenças observadas nas freqüências de isolamento dentro de uma mesma categoria de produto.

Quanto aos sorovares de *Salmonella* comumente identificados no Brasil, a partir de 1993 houve um significativo aumento no isolamento de *S. Enteritidis*, tornando-se desde 1994, o sorovar mais freqüentemente isolado de casos de infecções humanas e também de alimentos, principalmente ovos, alimentos preparados com ovos crus, carne de aves e derivados (TAVECHIO et al., 1996). No Estado de São Paulo, os sorovares mais prevalentes em isolados de origem humana, no período de 1996 a 2003, foram *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enterica* (4,5,12:i:-) e *S. Typhi* (FERNANDES et al, 2006). Em amostras não humanas, os sorovares mais freqüentes, entre 1996 e 2000, foram *Salmonella* Enteritidis, Senftenberg, Hadar, Agona e Typhimurium (TAVECHIO et al., 2002).

DE CASTRO et al. (2002) relataram mudanças no padrão de sorovares de *Salmonella* isolados de amostras clínicas no período de 1985 a 1999, no município de Ribeirão Preto. *S. Agona* representava 27% dos isolados entre 1985 e 1989 e reduziu para 4% entre 1995 e 1999. O isolamento de *S. Enteridis* permaneceu abaixo de 1% até 1989; subiu para 5,9% entre 1990 e 1994 e aumentou para 32,3% entre 1995 e 1999.

Estudos mais abrangentes, envolvendo diferentes Estados do Brasil, confirmam a elevada prevalência de *S. Enteritidis*. KANASHIRO et al. (2005) analisaram diferentes tipos de amostras coletadas em sistemas de criação de aves de corte e de postura, localizadas em várias regiões do Brasil, e verificaram que entre as 485 amostras positivas para salmonela, 304 (62,7%) pertenciam ao sorovar *Enteritidis*. No período de 2004 a 2006, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) coordenou o Programa de Monitoramento da Prevalência e Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF). Neste estudo foram analisadas 2.710 carcaças de frango congeladas, provenientes de 13 Estados e do Distrito Federal, com isolamento de 250 cepas de *Salmonella*. Entre os 18 sorovares identificados, a maior frequência foi observada para *S. Enteritidis* (48,8%), seguido de *S. Infantis* (7,6%), *S. Typhimurium* (7,2%), *S. Heidelberg* (6,4%), *S. Mbandaka* (4,8%) e 25% distribuídos entre outros diferentes sorovares (ANVISA, 2008).

2.3 PATOGENICIDADE E FATORES DE VIRULÊNCIA

A principal via de transmissão da *Salmonella* é a fecal-oral. Após a ingestão do alimento contaminado, o patógeno coloniza e invade as células do epitélio intestinal resultando na destruição de enterócitos e das células M (WALLIS e GALYOV, 2000; D'AOUST E MAURER, 2007). Após atravessarem a camada epitelial intestinal, as bactérias alcançam a lâmina própria (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas), onde proliferam. São fagocitadas pelos monócitos e macrófagos, resultando em resposta inflamatória. Esta resposta pode ser decorrente da hiperatividade do sistema retículoendotelial e da liberação de prostaglandinas, as quais são estimuladoras da adenilciclase, o que resulta em um aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa, podendo apresentar sangue (WALLIS e GALYOV, 2000; HAIMOVICH E VENKATESAN, 2006). Ao contrário do que ocorre na febre tifóide, nas enterocolites a invasão de *Salmonella* spp. geralmente fica limitada à lâmina própria e nestes casos, raramente se observa septicemia ou infecção sistêmica (D'AOUST E MAURER, 2007).

A gravidade da doença está relacionada com as condições da espécie hospedeira e do sorovar envolvido (WALLIS e GALYOV, 2000; MARCUS et al, 2000). Os processos de adesão, invasão e replicação da *Salmonella* são complexos e já foram estudados em culturas celulares (KIAMA et al, 2006) e em animais laboratorialmente infectados (MATSUI et al., 2001; ZHANG et al., 2002; COBURN et al., 2005; KISS et al., 2007), sendo determinados por fatores de virulência como plasmídeos, toxinas, fimbrias, flagelos e ilhas de patogenicidade (VAN ASTEN e VAN DIJK, 2005).

Evidências sugerem que as fimbrias bacterianas podem desempenhar um papel importante no mecanismo de aderência à superfície celular, bem como na patogênese da salmonela (DIBB-FULLER et al., 1999; NAUGHTON et al., 2001; DE BUCK et al., 2003). No genoma de *Salmonella* já foram identificados 20 operons distintos que codificam a produção de fimbrias (EDWARDS et al., 2002).

As fimbrias são codificadas, principalmente, por cinco operons: *fim* (fimbria tipo I), *agf* (fimbria agregativa), *lpf* (fimbria polar longa), *pef* (fimbria codificada por plasmídeo) e *sef* (fimbria *Salmonella* Enteritidis). Os operons *fim* e *agf* são altamente conservados entre os isolados de *Salmonella*, enquanto que os operons *sef* e *pef* possuem distribuições limitadas (BÄUMLER et al, 1997).

O operon *sef* está localizado em uma pequena ilha de patogenicidade no cromossomo bacteriano, entretanto uma cópia também pode estar presente em plasmídeo (COLLIGHAN e WOODWARD, 2001). O operon é constituído por quatro genes estruturais (*sef*ABCD) necessários para a biogênese da fimbria SEF14 que é expressa unicamente por sorovares de *Salmonella* do grupo D, incluindo *S. Enteritidis* e *S. Dublin*. O papel desta fimbria na patogênese de salmonela está relacionado com etapas da infecção posteriores a colonização do epitélio intestinal do hospedeiro, sendo considerada essencial para a aderência ou sobrevivência da bactéria em macrófagos (EDWARDS et al., 2000). Já a fimbria PEF, codificada pelos genes *pef*ABCD localizados em plasmídeos de virulência, está envolvida na adesão do epitélio intestinal e secreção de fluidos (BÄUMLER et al, 1996).

A maioria dos genes de virulência de *Salmonella* está localizada em regiões distribuídas no cromossomo, denominadas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (*Salmonella* Pathogenicity Island - SPI) (OCHMAN e GROISMAN, 1996; MARCUS,

2000). Sugere-se que esses genes foram adquiridos por transferência horizontal de fagos ou plasmídeos de outros gêneros bacterianos, sendo considerados altamente conservados entre os diferentes sorovares de *Salmonella*. A aquisição desses genes pode ter levado ao aumento da patogenicidade da *Salmonella* spp. durante a sua evolução (OCHMAN e GROISMAN, 1996).

No cromossomo de *Salmonella* foram identificadas cinco SPI, denominadas SPI-1 a SPI-5. Na SPI-1 estão agrupados genes que codificam o sistema de secreção tipo III constituído por um complexo de proteínas responsáveis pela adesão e invasão da célula hospedeira (COBURN et al., 2007), assim como genes relacionados com a produção de toxinas (HACKER et al., 1997). Os genes presentes nas regiões SPI-2, SPI-3 e SPI-4 são necessários para a sobrevivência e multiplicação do patógeno no hospedeiro e são manifestados na fase sistêmica da doença. A SPI-5 está relacionada com a resposta inflamatória e secreção de íons cloreto, caracterizando a fase entérica da doença (MARCUS, 2000). PARKHILL et al. (2001) relataram a ocorrência de mais cinco regiões designadas como SPI (SPI-6 a SPI-10) em *S. Typhi*, envolvidas com a codificação de fimbrias, resistência a bacteriocinas e produção de toxinas.

Entre os genes presentes na região SPI-1 está o *invA* (LOSTROH e LEE, 2001). O gene *invA* foi caracterizado por GALAN e CURTISS (1989) e identificado como o primeiro de um operon de genes (*invABCEFGH*) que codifica a produção de proteínas, do sistema de secreção do tipo III, sendo considerado um componente essencial para a patogênese da doença (WALLIS e GALYOV, 2000; MARCUS et al., 2000). O grupo de genes *inv* está presente na maioria das salmonelas e são considerados importantes na identificação do gênero (SANTOS et al., 2001).

Além dos fatores de virulência associados com as ilhas de patogenicidade de *Salmonella*, alguns podem ser encontrados em plasmídeos (FLUIT, 2005). Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares, extra-cromossomais, que podem conter genes que conferem vantagens seletivas para a bactéria, como virulência e resistência antimicrobiana (SHEPPARD et al., 2003).

Embora *S. Enteritidis* e outros sorovares apresentem plasmídeos de virulência de diferentes tamanhos e composição genética, todos apresentam uma região conservada de aproximadamente 7,8 Kb denominada operon *spv* (*Salmonella* plasmid virulence). O operon é constituído por cinco genes: um regulador positivo *spvR* e quatro genes estruturais *spvABCD*. A expressão desses genes é importante para a sobrevivência e multiplicação intracelular da *Salmonella*, contribuindo para fase sistêmica da doença (FLUIT, 2005). Os sorovares de *Salmonella* (exceto *S. Typhi*) que não possuem o operon *spv* apresentam menor capacidade de proliferarem além da camada superficial epitelial e raramente estão associados com infecção sistêmica, mas podem causar gastroenterite (LIBBY et al., 1997; GULIG et al., 1998). Os genes *spvB* e *spvC* são considerados efetores centrais do operon, uma vez que são suficientes para conferir virulência a *Salmonella* Typhimurium inoculada em camundongos (MATSUI et al., 2001).

2.4 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Na maioria dos casos de salmonelose, a manifestação clínica é uma enterite moderada auto-limitante com duração de 2 a 7 dias e, geralmente, não há necessidade de antibioticoterapia. Entretanto, em indivíduos imunocomprometidos, idosos e

crianças, assim como em casos de salmonelose severa ou sistêmica, a terapia antimicrobiana é essencial (RUIZ et al., 2004). Durante muitos anos a ampicilina, o trimetoprim-sulfametoxazol e o cloranfenicol foram drogas de escolha para o tratamento de infecções severas por *Salmonella*, mas o aumento da taxa de resistência a esses agentes tem reduzido significativamente a sua eficiência (OLSEN et al., 2001; WINOKUR et al., 2000). Desta forma, por suas propriedades farmacodinâmicas e baixo nível de resistência em *Salmonella*, as cefalosporinas de espectro expandido e as fluoroquinolonas passaram a ser utilizadas no tratamento destas doenças (ANGULO et al., 2000; CHIAPPINI et al., 2002). Entretanto, há relatos de surtos ou casos de infecções por cepas resistentes a estas drogas (DUNNE et al., 2000; FEY et al., 2000).

O surgimento e disseminação de cepas de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos, particularmente aquelas resistentes a múltiplas drogas representa, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública.

Nos Estados Unidos, entre os dez sorovares mais comumente isolados de infecções em humanos, oito apresentam cepas com resistência a cinco ou mais drogas antimicrobianas, sendo essa característica observada, principalmente, entre os sorovares Typhimurium, Heidelberg e Newport (CDC, 2004). *S. Typhimurium* multi-resistente foi isolada pela primeira vez em 1964 no Reino Unido (ANDERSON, 1968). Durante a década de 1990, mundialmente, houve um aumento acentuado no número de isolados deste sorovar com esse fenótipo (THRELFALL, 2002). As cepas de *Salmonella Typhimurium* multi-resistentes podem apresentar dois perfis de resistência: a) resistência a ampicilina, canamicina, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina ou b) resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina (resistência tipicamente associada a *S. Typhimurium* fagotipo DT 104). Os isolados de

Salmonella Heidelberg comumente apresentam resistência a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftiofur e cefalotina. Entre as cepas de *S. Newport*, a resistência mais comumente encontrada está relacionada à ampicilina, cloranfenicol, amoxicilina-ácido clavulânico, ceftiofur, cefalotina, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina (CDC, 2004). Cepas multi-resistentes também foram identificadas em outros sorovares epidemiologicamente importantes como Agona, Dublin, Hadar e Senftenberg (CDC, 2004).

Na Europa, o monitoramento da resistência antimicrobiana em 10 países, durante cinco anos, revelou um aumento na ocorrência de resistência em *Salmonella* não-tifóides isoladas de casos de infecção em humanos. A taxa de resistência passou de 57% em 2000 para 66% em 2004. Por outro lado, houve uma redução de 18% para 15%, no número de cepas multi-resistentes (quatro ou mais drogas). Os isolados comumente apresentaram resistência às sulfonamidas, tetraciclina, ampicilina e estreptomicina. Foi observado um aumento significativo no número de cepas resistentes ao ácido nalidíxico (MEAKINS et al, 2008).

No Canadá, o Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) realiza o monitoramento da resistência antimicrobiana em bactérias entéricas isoladas em diferentes pontos da cadeia alimentar e de casos de doença em humanos. No período de 2003 a 2005, em isolados de amostras clínicas, houve um aumento significativo nas taxas de resistência à ampicilina (35% a 47%) em *S. Heidelberg*; ácido nalidíxico (44% a 72%), ampicilina (10% a 26%), tetraciclina (9% a 24%) e trimetoprim-sulfametoxazol (9% a 26%) em *S. Typhi*; ceftiofur (2% a 4%) e ácido nalidíxico (1% to 3%) em *S. Typhimurium*. Em amostras de fezes de suínos e aves coletadas em 2005, foi observada resistência a uma ou mais drogas em 47% (100/210)

e 40% (80/199) dos isolados, respectivamente. Em amostras de frango adquiridas no comércio, 37% (27/73) das cepas isoladas apresentou resistência à pelo menos um agente antimicrobiano (CIPARS, 2005).

No Brasil, embora não haja um programa de monitoramento com abrangência nacional, estudos relataram a ocorrência de cepas resistentes e multi-resistentes em *S. Enteritidis* (FERNANDES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; CARDOSO et al., 2006), *S. Infantis* (FONSECA et al., 2006), *S. Hadar* (RIBEIRO et al., 2006), *S. Typhimurium* (GHILARDI et al., 2006; BESSA et al., 2007), *S. I 1,4,[5],12:i:-* (TAVECHIO et al., 2004), *S. Agona* (MICHAEL et al., 2005) e *S. Derby* (MICHAEL et al., 2006b), isoladas de diferentes fontes.

Além dos aspectos inerentes ao microrganismo, o aumento de cepas resistentes pode ser atribuído ao uso abusivo de antimicrobianos como agentes terapêuticos ou profiláticos na medicina humana e veterinária, assim como promotores de crescimento na produção animal. Estudos sugerem que a fonte primária de infecções por cepas resistentes são os produtos de origem animal (SWARTZ, 2002), uma vez que o uso de antibióticos neste segmento contribui para a seleção de linhagens resistentes que podem ser transferidas aos humanos pela cadeia alimentar (ANGULO et al., 2000; ANTUNES et al., 2003; CARRAMIÑANA et al., 2004; NAYAK et al., 2004). Segundo SKOV et al. (2007), os produtos cárneos importados representam uma importante fonte de cepas resistentes na Dinamarca, enquanto que MEAKINS et al. (2008) relatam que o aumento da resistência em isolados de origem humana na Inglaterra e País de Gales pode ser atribuído ao consumo de ovos contaminados importados.

Entretanto, alguns estudos mostram que não há correlação entre o uso de drogas na medicina veterinária com o aumento do número de cepas resistentes. Estudo

realizado por THREFALL et al. (2006) demonstrou que o aumento do uso veterinário de tetraciclina e ampicilina tiveram impacto insignificante na incidência de resistência a estas drogas em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Da mesma forma, a redução no uso de trimetoprim não refletiu na queda acentuada de resistência a este antimicrobiano nos dois sorovares estudados. Há relatos, ainda, da ocorrência de microrganismos resistentes em sistemas de produção de aves e suínos livres do uso de antibióticos como promotores de crescimento ou com finalidades terapêuticas. Nesses casos, fatores ambientais teriam um papel importante na disseminação de cepas resistentes (GEBREYES et al., 2005; TEIXEIRA, 2006; THAKUR et al., 2007).

Embora não haja consenso sobre o real impacto do uso de agentes antimicrobianos na produção animal, o emprego destas drogas neste segmento vem sendo discutido e, desde então, alguns países adotaram novas regulamentações quanto ao uso das mesmas para reduzir a emergência de cepas resistentes (SARMAH et al., 2006).

Na União Européia, o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento na produção animal está proibido desde 2006 (CASTANON, 2007). Por outro lado, nos Estados Unidos, há poucas regulamentações sobre o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (DIBNER e RICHARDS, 2005). Recentemente o uso de fluoroquinolonas como agente terapêutico em animais foi suspenso devido à similaridade com antibióticos utilizados para tratamento de infecções em humanos (FDA, 2005a), entretanto outras drogas como tetraciclina, penicilinas, macrolídeos, lincomicina e virginiamicina ainda são aprovadas para uso como promotores de crescimento (SARMAH et al., 2006).

No Brasil, o uso de clortetraciclina, oxitetraciclina, penicilinas e sulfonamidas sistêmicas para alimentação animal está proibido de acordo com a Portaria Ministerial no 193, de 12 de maio de 1998 (BRASIL, 1998). A Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003 (BRASIL, 2003), proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso das drogas cloranfenicol e nitrofuranos e produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e na alimentação de animais. Já a Instrução Normativa nº 11, de 24 de novembro de 2004 (BRASIL, 2004) proíbe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso da substância química denominada olaquinox, como aditivo promotor de crescimento em animais de produção.

No início de 2007 foi submetida à consulta pública a Portaria nº 29, de 29 de janeiro de 2007, referente ao Projeto de Instrução Normativa que trata do Regulamento Técnico para o licenciamento de produtos antimicrobianos de uso veterinário. O Regulamento Técnico proposto sugere que agentes antimicrobianos utilizados com fins terapêuticos sejam evitados na indicação de aditivos alimentares, promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos destinados a animais e proíbe o uso de cloranfenicol, tetraciclina, β -lactâmicos, quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (BRASIL, 2007).

A União Européia adotou o princípio da precaução ao banir o uso de antibióticos, na produção animal, como promotores de crescimento. Entretanto, o banimento vem sendo discutido, uma vez que os efeitos seriam limitados devido a relatos de prejuízos à saúde animal e também do aumento de doenças em humanos e nas taxas de resistência (COX e RICCI, 2008).

2.5 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

O desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos pode ocorrer por diferentes mecanismos bioquímicos como produção de enzimas que inativam agentes antimicrobianos por degradação ou modificação estrutural, alteração da permeabilidade bacteriana ao antimicrobiano, ativação de bombas de efluxo e modificação do sítio alvo de ação da droga (SEFTON, 2002).

Os aminoglicosídeos atuam na célula bacteriana ligando-se à subunidade 30S do ribossomo bacteriano, inibindo a síntese de proteínas (SEFTON, 2002). A resistência aos aminoglicosídeos está relacionada com a expressão de enzimas modificadoras da estrutura das drogas denominadas aminoglicosídeo acetiltransferases, aminoglicosídeo fosfotransferases e aminoglicosídeo nucleotidiltransferases (POOLE, 2005). As enzimas aminoglicosídeo acetiltransferases, codificadas pelo gene *aac*, conferem resistência à gentamicina, trombamicina e canamicina (SMITH e BAKER, 2002). As aminoglicosídeo fosfotransferases, codificadas pelo gene *aph*, são responsáveis pela resistência à estreptomicina, canamicina e neomicina e as aminoglicosídeo nucleotidiltransferases, codificadas pelo gene *aad*, estão associadas com a resistência à estreptomicina (*aadA*) e gentamicina, trombamicina e canamicina (*aadB*) (MICHAEL et al, 2006a).

As penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos constituem os três maiores grupos de antibióticos β -lactâmicos. O efeito antimicrobiano dessas drogas ocorre por meio da inibição da ação de proteínas, conhecidas como proteínas de ligação às penicilinas, envolvidas na síntese de peptideoglicano, um componente essencial da parede celular bacteriana (SEFTON, 2002).

A resistência bacteriana aos β -lactâmicos é atribuída a pelos menos três mecanismos: inacessibilidade da droga ao seu sítio alvo de ação (proteínas de ligação às penicilinas), modificação do sítio alvo da droga e/ou inativação das drogas pela enzima β -lactamase (LI e NIKAIDO, 2004; POOLE, 2004). Em bactérias Gram-negativas o mecanismo de resistência mais comum está associado à secreção de β -lactamases, enzimas capazes de degradar a estrutura química (anel β -lactâmico) dos antimicrobianos (BUSH et al., 1995). Entre as β -lactamases, a mais preocupante é a enzima AmpC, codificada pelo gene *bla*_{CMY}, que pode estar envolvida na resistência a um grande número de antibióticos, incluindo a ampicilina, ceftiofur e ceftriaxona (AARESTRUP et al., 2004).

As quinolonas e fluorquinolonas são drogas bactericidas sintéticas que atuam na DNA girase e DNA topoisomerase IV, inibindo a replicação do DNA bacteriano. A resistência a estes agentes é atribuída, principalmente, a mutações nos genes *gyrA* e *gyrB* que codificam subunidades da enzima DNA girase e no gene *parC* que codifica a subunidade da topoisomerase IV (JACOBY, 2005).

O mecanismo de ação do cloranfenicol envolve a ligação da droga à enzima peptidiltransferase da subunidade 50S do ribossomo bacteriano, inibindo a formação das pontes peptídicas. A tetraciclina impede a ligação do tRNA ao sítio A da subunidade ribossomal 30S, inibindo a síntese de proteínas (SEFTON, 2002). A resistência a esses agentes antimicrobianos é mediada por bombas de efluxo que removem níveis tóxicos da droga da parede celular (BUTAYE et al., 2003). Os genes *tet* conferem resistência à tetraciclina (CHOPRA e ROBERTS, 2001) e os genes *floR* (WHITE et al., 2000) e *cml* (CABRERA et al., 2004) ao cloranfenicol. A resistência ao

cloranfenicol também pode ser atribuída a enzimas que alteram o sítio de ligação da droga, sendo codificadas pelos genes *cat* (ALCAINE et al., 2007).

As drogas trimetoprim e as sulfonamidas inibem enzimas envolvidas na biosíntese do ácido fólico na célula bacteriana. A resistência às sulfonamidas está associada, freqüentemente, com a aquisição dos genes *sul*, os quais codificam a produção da enzima diidropteroato sintetase modificada que tem pouca afinidade com as sulfonamidas, mas que apresentam função na biosíntese do ácido fólico (ANTUNES et al., 2005). Da mesma forma, a resistência ao trimetoprim, codificada pelos genes *dhfr*, está associada à produção da enzima dihidrofolato redutase modificada que apresenta afinidade reduzida ao agente antimicrobiano, permitindo a biosíntese do ácido fólico na presença da droga (ALONSO e GREADY, 2006).

2.6 MECANISMOS DE DISSEMINAÇÃO DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência bacteriana pode ser intrínseca, ou seja, quando faz parte das características naturais do microrganismo, ou adquirida (TENOVER, 2006). A maioria dos microrganismos resistentes aos agentes antimicrobianos surgiu devido a mutações genéticas espontâneas, seguidas de uma grande pressão seletiva do ambiente (FDA, 2005b). O uso de drogas antimicrobianas na medicina humana e veterinária induz a pressão seletiva sobre as cepas bacterianas, favorecendo a sobrevivência das resistentes em relação às sensíveis a essas drogas. A aquisição de material genético que confere resistência, por transferência horizontal ou vertical, representa um fator predominante associado com a emergência, evolução e disseminação desses marcadores genéticos (MIRIAGOU et al., 2006).

Os genes de resistência podem ser codificados por elementos genéticos extra-cromossomais, como os plasmídeos, ou por seqüências provenientes de outro genoma que foram recombinadas no cromossomo (O'BRIEN, 2002).

A disseminação de resistência antimicrobiana mediada por plasmídeos representa uma importante forma para *Salmonella* adquirir resistência. Estudos têm demonstrado a transferência de resistência antimicrobiana entre *Salmonella* e microrganismos relacionados por conjugação experimental (ZHAO et al., 2003; AARESTRUP et al., 2004). Os genes de resistência codificados em plasmídeos geralmente estão localizados em transposons (O'BRIEN, 2002) que correspondem a elementos genéticos constituídos por seqüências de DNA que incluem, além dos genes de resistência, genes que codificam a enzima transposase que permite que o transposon seja incorporado ao plasmídeo ou cromossomo bacteriano (CARATTOLI, 2003).

Além da presença de plasmídeos de resistência e virulência distintos, alguns microrganismos podem apresentar genes de resistência e virulência em um único plasmídeo. GUERRA et al. (2002) identificaram um plasmídeo de conjugação em *S. Typhimurium* carregando os genes de virulência *spvA*, *spvB*, *spvC* e *rck*, assim como genes que conferem resistência a ampicilina, estreptomicina, mercúrio, cloranfenicol e tetraciclina. Este fato pode ser considerado de grande importância para a saúde pública, uma vez que a transferência de plasmídeos com estas características para outras bactérias pode contribuir para a existência de cepas mais virulentas, além de multi-resistentes (MIRIAGOU et al., 2006; RYCHLIK et al., 2006).

A resistência antimicrobiana pode estar relacionada com a aquisição de elementos genéticos móveis denominados integrons. Os integrons codificam um

sistema de recombinação sítio-específico que reconhece e captura cassetes de genes exógenos (HALL e COLLIS, 1995) e a produção de uma enzima denominada integrase, envolvida nos eventos de recombinação (FLUIT, 2005). Quatro classes de integrons já foram descritas, entretanto os integrons Classe 1 são mais comumente encontrados em bactérias patogênicas (CARATTOLI, 2001). Os integrons podem ser encontrados em plasmídeos, transposons e no cromossomo bacteriano (FLUIT e SCHMITZ, 2004).

O perfil de resistência antimicrobiana pode ser utilizado como uma informação adicional no processo de tipificação de linhagens bacterianas. Além disso, o monitoramento da resistência fornece dados sobre a situação das populações bacterianas, em diversas áreas geográficas e ao longo do tempo. A caracterização fenotípica e genotípica de microrganismos patogênicos é de grande importância em estudos epidemiológicos, uma vez que permite estabelecer padrões de disseminação e determinar e monitorar reservatórios de cepas epidêmicas, auxiliando no desenvolvimento de medidas de controle e prevenção das DTA.

Cabe ressaltar que no Brasil há poucos estudos sobre resistência antimicrobiana e pesquisa de genes de virulência em *Salmonella* e outros patógenos isolados de alimentos, principalmente em cepas envolvidas em casos de toxinfecções alimentares. Não se sabe também se a resistência antimicrobiana e os genes de virulência destas cepas diferem daquelas encontradas nas cepas isoladas de alimentos não associados a surtos, justificando a realização do presente estudo.

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivos:

- a) avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares;
- b) verificar a presença dos genes de virulência *invA*, *spvC*, *pefA* e *sefA* em cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares;
- c) comparar os perfis de susceptibilidade antimicrobiana e de virulência entre as cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos associados à toxinfecções alimentares com aquelas não envolvidas em surtos;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepas de *Salmonella* spp.

As cepas de *Salmonella* spp. utilizadas no presente estudo foram selecionadas entre aquelas isoladas de alimentos analisados na Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, no período de 1983 a 2007. Das cepas disponíveis, foram selecionadas 237, pertencentes a diversos sorovares, sendo 42 isoladas de alimentos envolvidos em toxinfecções alimentares (Tabela 1) e 195 de alimentos não associados a surtos (Tabela 2). As cepas foram mantidas em gelose conservação até o momento de realização dos ensaios.

Tabela 1. Identificação e origem das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados à toxinfecções alimentares.

Identificação	Sorovar	Alimento	Ano
1	S. Enteritidis	Vegetal	1993
2	S. Enteritidis	Coxa de frango frita	1995
3	S. Enteritidis	Salada de maionese	1994
4	S. Enteritidis	Carne assada	1994
5	S. Enteritidis	Espeto de hambúrguer c/queijo	1995
6	S. Enteritidis	Produto de confeitaria	1995
7	S. Enteritidis	Maionese	1995
9	S. Enteritidis	Lentilha	1996
10	S. Enteritidis	Coxa de frango assada	1997
20	S. Enteritidis	Bolo	1999
24	S. Enteritidis	Sorvete chocolate e creme	2000
25	S. Enteritidis	Peito de frango in natura	2000
26	S. Enteritidis	Alface	2000
27	S. Enteritidis	Maionese	2000
28	S. Enteritidis	Pudim	2001
29	S. Enteritidis	Feijoada	2001
31	S. Enteritidis	Fraldinha ao alho	2001
32	S. Enteritidis	Salada de tomate e mussarela	2001
34	S. Enteritidis	Codorna	2001
36	S. Enteritidis	Bolo	2001
37	S. Enteritidis	Alcatra	2001
38	S. Enteritidis	Bife a milanesa	2001
40	S. Enteritidis	Peru congelado	2001
42	S. Enteritidis	Maionese	2002
45	S. Enteritidis	Produto cárneo	2002
46	S. Enteritidis	Maionese	2002
47	S. Enteritidis	Maionese	2002
48	S. Enteritidis	Torta de côco	2002
49	S. Enteritidis	Sorvete caseiro	2002
50	S. Enteritidis	Salada de maionese	2003
51	S. Enteritidis	Pãozinho com patê	2003
79	S. Enteritidis	Maionese caseira	2005
80	S. Enteritidis	Mousse de chocolate	2005
82	S. Enteritidis	Coxinha frita	2006
83	S. Enteritidis	Sonho	2007
99	S. Typhimurium	Ovo de codorna	2007
101	S. Agona	Água	1988
134	S. Infantis	Água	2004
145	S. Brandenburg	Água	1988
197	S. Saintpaul	Requeijão	1998
220	S. I 6,7:r:-	Coxinha de frango	1993
223	S. Sandiego	Água	1988

Tabela 2. Identificação e origem das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos **não** associados à toxinfecções alimentares.

Identificação	Sorovar	Alimento	Ano
8	S. Enteritidis	Gema de ovo liofilizada	1995
11	S. Enteritidis	Frango	1997
12	S. Enteritidis	Frango	1997
13	S. Enteritidis	Frango	1997
14	S. Enteritidis	Frango	1997
16	S. Enteritidis	Frango	1997
17	S. Enteritidis	Frango	1997
18	S. Enteritidis	Frango	1997
21	S. Enteritidis	Lioprotein 1:300	1999
22	S. Enteritidis	Carne crua	2000
23	S. Enteritidis	Carne crua	2000
39	S. Enteritidis	Ostras	2001
43	S. Enteritidis	Carne crua	2002
44	S. Enteritidis	Carne crua	2002
52	S. Enteritidis	Carcaça de frango	2003
53	S. Enteritidis	Empanado de frango pré-frito	2003
54	S. Enteritidis	CMS frango	2004
55	S. Enteritidis	Peito de frango congelado	2004
56	S. Enteritidis	Peito de frango congelado	2004
57	S. Enteritidis	CMS frango	2004
58	S. Enteritidis	Peito de frango	2004
59	S. Enteritidis	CMS frango	2004
60	S. Enteritidis	CMS frango	2004
61	S. Enteritidis	Peito Frango congelado	2004
63	S. Enteritidis	Peito com carcaça	2004
64	S. Enteritidis	CMS frango	2004
65	S. Enteritidis	Peito de frango congelado	2004
66	S. Enteritidis	CMS frango	2004
67	S. Enteritidis	CMS frango	2004
68	S. Enteritidis	CMS frango	2004
69	S. Enteritidis	Peito de frango	2004
70	S. Enteritidis	CMS frango	2004
71	S. Enteritidis	CMS frango	2004
72	S. Enteritidis	Peito de frango	2004
73	S. Enteritidis	CMS frango	2004
75	S. Enteritidis	Produto cárneo	2004
76	S. Enteritidis	Produto cárneo	2004
77	S. Enteritidis	CMS frango	2004
78	S. Enteritidis	CMS frango	2004

Continua

Tabela 2. Identificação e origem das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos **não** associados à toxinfecções alimentares - **Continuação**

Identificação	Sorovar	Alimento	Ano
81	S. Enteritidis	Pimenta do reino	2006
84	S. Typhimurium	Pasta de peixe	1986
85	S. Typhimurium	Carne de porco crua	1992
86	S. Typhimurium	Filé de frango cru	1992
87	S. Typhimurium	Miúdos de frango	1992
88	S. Typhimurium	Lingüiça caseira crua	1993
89	S. Typhimurium	Produto cárneo	1993
90	S. Typhimurium	Copa salgada	1993
91	S. Typhimurium	Carne crua	1993
92	S. Typhimurium	Hamburguer cru	1997
93	S. Typhimurium	Acem s/ osso	2000
94	S. Typhimurium	Produto cárneo	2002
95	S. Typhimurium	Produto cárneo	2002
96	S. Typhimurium	Produto cárneo	2002
98	S. Typhimurium	Costela suína crua	2007
100	S. Agona	Contra-filé cru	1986
102	S. Agona	Carne moída crua	1991
103	S. Agona	Peito de frango cru	1993
104	S. Agona	Lingüiça caseira	1993
105	S. Agona	Produto cárneo	1993
106	S. Agona	Carne porco crua	1993
107	S. Agona	Lingüiça	1993
108	S. Agona	Frango resfriado	1993
110	S. Agona	Carne crua	2002
111	S. Panama	Carne moída crua	1983
112	S. Panama	Carne pré-moída	1986
113	S. Panama	Lingüiça	1986
114	S. Panama	Carne pré-moída crua	1986
115	S. Panama	Carne bovina	1990
116	S. Panama	Carne bovina	1990
117	S. Panama	Carne crua	1993
118	S. Panama	Frango cru	1993
119	S. Panama	Lingüiça crua	1993
120	S. Panama	Lingüiça caseira	1993
121	S. Panama	Lingüiça crua	2002
122	S. Anatum	Carne mista	1987
123	S. Anatum	Carne bovina crua	1992
124	S. Anatum	Carne bovina crua	1992
125	S. Anatum	Carne bovina crua	1992
126	S. Anatum	Lingüiça frescal calabresa	1993

Tabela 2. Identificação e origem das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos **não** associados à toxinfecções alimentares - **Continuação**

Identificação	Sorovar	Alimento	Ano
127	S. Anatum	Lingüiça frescal porco	1993
128	S. Anatum	Produto cárneo	1993
129	S. Anatum	Salmoura com língua	1993
130	S. Anatum	Lingüiça caseira	1993
131	S. Anatum	Carne pré-moída crua	1993
132	S. Anatum	Carne suína crua	1998
133	S. Anatum	CMS Frango	2004
135	S. Infantis	Frango cru	1984
136	S. Infantis	Pimenta do reino	1992
137	S. Infantis	Carne pré-moída crua	1993
138	S. Infantis	Carne crua	1993
139	S. Infantis	Frango	1993
140	S. Infantis	Ovos líquidos	1993
141	S. Infantis	Ostra	1999
142	S. Infantis	Carne crua	2000
143	S. Brandenburg	Lingüiça	1986
144	S. Brandenburg	Lingüiça	1986
146	S. Brandenburg	Lingüiça salgada crua	1992
147	S. Brandenburg	Lingüiça crua	1992
148	S. Brandenburg	Lingüiça crua	1992
149	S. Brandenburg	Carne	1992
150	S. Brandenburg	Frango cru	1993
151	S. Hadar	Frango cru temperado	1987
152	S. Hadar	Pimenta preta	1991
153	S. Hadar	Carne de porco crua	1992
154	S. Senftenberg	Peixe cavalinha	1992
155	S. Senftenberg	Peixe fresco	2004
156	S. Muenster	Produto cárneo	1996
157	S. Madelia	Ostra	1994
158	S. Madelia	Pescado	1997
159	S. Madelia	Ostras	1999
160	S. Madelia	Ostras	2002
161	S. Ohio	Carne bovina moída	1990
162	S. Ohio	Lingüiça crua	1992
163	S. Ohio	Peito de frango	1993
164	S. Ohio	Fruto de mar	1993
165	S. Ohio	Almôndega	1998
166	S. Oranienburg	Carne crua	1986
167	S. Oranienburg	Carne crua	1986
168	S. Oranienburg	Pimenta preta	1991

Tabela 2. Identificação e origem das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos **não** associados à toxinfecções alimentares - **Continuação**

Identificação	Sorovar	Alimento	Ano
169	S. Oranienburg	Carne pré-moída	1991
170	S. Oranienburg	Pimenta do reino	2003
171	S. Cerro	Carne moída crua	1990
172	S. Cerro	Lioprotein 1:300	1999
173	S. Schwarzengrund	CMS frango	2004
174	S. Schwarzengrund	CMS frango	2004
175	S. Schwarzengrund	CMS frango	2004
176	S. Schwarzengrund	CMS frango	2004
177	S. Schwarzengrund	CMS frango	2004
178	S. Mbandaka	Semente de pimentão desidratado	1996
179	S. Mbandaka	Frango	1997
180	S. Mbandaka	Piranha	2002
182	S. Mbandaka	Lingüiça	2002
183	S. Heidelberg	Carne bovina	1986
184	S. Heidelberg	Lingüiça mista	1986
185	S. Heidelberg	Espeto de frango temperado	1986
186	S. Heidelberg	Lingüiça	1991
187	S. Heidelberg	Macarrão de sêmola	1992
188	S. Heidelberg	Costela salgada	1993
189	S. IV 43:Z4, Z24:-	Pescado	1996
190	S. IV 43:Z4, Z24:-	Pescado	1997
191	S. I 4, 5, 12: b: -	Côco	2000
192	S. I 4, 5, 12: i: -	Leite pasteurizado tipo C	1990
193	S. I 4, 5, 12: i: -	Produto cárneo	2002
194	S. I 4, 5, 12: i: -	Lingüiça de porco crua	2002
195	S. I 4, 5, 12: i: -	Lombo sem osso	2002
196	S. Saintpaul	Pimenta do reino	1993
198	S. Saintpaul	Frango	2002
199	S. Derby	carne assada	1984
200	S. Derby	Produto cárneo	1997
201	S. Derby	Lingüiça crua	2002
202	S. Glostrup	Pimenta do Reino	1992
203	S. Glostrup	Ostras	2001
204	S. Javiana	Carne crua	1992
205	S. enterica 3, 10: Z: -	Queijo	2002
206	S. Give	Carne crua	1992
207	S. Give	Mistura de cereais	1999
208	S. Emek	Lingüiça	2002

Tabela 2. Identificação e origem das cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos **não** associados à toxinfecções alimentares - **Continuação**

Identificação	Sorovar	Alimento	Ano
209	S. Bredeney	Rim bovino	1987
210	S. Bredeney	Carne moída	1990
211	S. Bredeney	Carne moída	1990
212	S. Bredeney	Mocotó	1992
213	S. Bredeney	Asa de peru congelada	1993
214	S. Bredeney	Asa de frango	2002
215	S. Bredeney	Costela de porco fresca	2002
216	S. Muenchen	Queijo	1993
217	S. I 4, 12: i:-	Carne moida crua	1991
218	S. I 4, 12: i:-	Carne moida crua	1991
219	S. I 6,7:r:-	Bucho fatiado cru	1990
221	S. I 6,7:r:-	Carne	1993
222	S. I 6,7:r:-	Lombo cru	2003
224	S. Sandiego	Frutos do mar	1997
225	S. Sandiego	Pescado	1997
226	S. Sandiego	Ostras	2001
227	S. London	Salmoura com costela	1993
228	S. London	Costela salgada	1993
229	S. London	Carne moida crua	2000
230	S. London	Lingüiça fresca	2002
231	S. Saphra	Ovo líquido	1993
232	S. Levingstone	Carne crua	2002
233	S. I 6, 8: E, H: -	Produto vegetal	1996
234	S. Lexington	Côco	2000
235	S. Brandenlsing	Produto cárneo	1994
236	S. Berta	Frango cru	1991
237	S. Poona	Pimenta do reino	2000
238	S. I 3, 10: - :1,6	Carne bovina moida	1990
239	S. Abaetetuba	Pimenta do reino	1986
240	S. I 13, 23: Z: -	Lingüiça	2002
241	S. I 6,8:Z10:-	Frango cru	1990
242	S. Rubislaw	Condimento	1997
243	S. Rubislaw	Pimenta negra	2001
244	S. Tennessee	Doce de amendoim	2002
245	S. 1,4, 5, 12	Pescado	2007
246	S. 1,4, 5, 12	Pescado	2007
247	S. Newport	Marisco	2007
248	S. Paratyphi B	Bagre	2006
249	S. Pomona	Ostras	2003

CMS: Carne mecanicamente separada

4.2 Pesquisa dos genes de virulência

A pesquisa do gene de virulência *pefA* foi realizada por PCR simplex e dos genes *invA*, *spvC* e *sefA* por PCR multiplex.

4.2.1 Extração do DNA genômico

Para extração do DNA foi utilizado o kit comercial Wizard[®] Genomic DNA Purification System (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

As cepas foram semeadas em ágar gelose conservação e incubadas a 35°C por 24 horas. Em seguida, uma suspensão bacteriana foi preparada, adicionando-se 2 a 3 colônias da cultura em 150 µL de solução salina tamponada fosfatada (PBS 0,15 M, pH 7,2). A esta suspensão foram adicionados 150 µL de solução de lise do ácido nucléico (*Nuclei Lysis Solution*). A mistura foi homogeneizada por inversão do microtubo (5-6 vezes), para lise das células. A esta mistura foram adicionados 50 µL de solução de precipitação de proteína (*Protein Precipitation Solution*) e agitado vigorosamente (10-20 seg). Após centrifugação a 13.000 x g por 3 min (Centrífuga Eppendorf, modelo 5417R) em temperatura ambiente (TA), o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo de 1,5 mL contendo 150 µL de isopropanol. O microtubo foi homogeneizado, por inversão, até o aparecimento de uma massa visível de DNA e então centrifugado a 13.000 x g por 3 min em TA. O sobrenadante foi desprezado. Para lavagem do DNA, foram adicionados ao sedimento 150 µL de etanol 70% e homogeneizado por inversão do microtubo (5-6 vezes). A mistura foi centrifugada a 13.000 x g por 3 min em TA e o sobrenadante descartado. Após a secagem do sedimento por 10 – 15 min em TA,

foram acrescentados 50 μ L de solução de rehidratação do DNA (*DNA Rehydration Solution*). A mistura foi incubada a 65°C por 1 h e armazenada a 4°C até o momento do uso. *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 foram utilizadas como controles positivos.

4.2.2 Primers

Para a reação de amplificação por PCR simplex foram utilizados *primers* para o gene *pefA*. Para a PCR multiplex foram empregados *primers* para os genes *invA*, *sefA* e *spvC*. Os *primers* estão esquematizados na Tabela 3.

Tabela 3. Seqüência de oligonucleotídeos utilizados como *primers* na PCR simplex e PCR multiplex.

Genes	Seqüência (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>invA</i> -1	TTG TTA CGG CTA TTT TGA CCA	521	SWAMY et al., 1996
<i>invA</i> -2	CTG ACT GCT ACC TTG CTG ATG		
<i>sefA</i> -3	GCA GCG GTT ACT ATT GCA GC	330	WOODWARD e KIRWAN, 1996
<i>sefA</i> -4	TGT GAC AGG GAC ATT TAG CG		
<i>spvC</i> -1	CGG AAA TAC CAT CTA CAA ATA	669	SWAMY et al., 1996
<i>spvC</i> -2	CCC AAA CCC ATA CTT ACT CTG		
<i>pefA</i> -1	TTC CAT TAT TGC ACT GGG TG	497	HANEDA et al, 2001
<i>pefA</i> -2	AAG CCA CTG CGA AAG ATG CC		

1 - sense

2 - anti - sense

4.2.3 Amplificação do DNA extraído

A solução para reação de PCR simplex foi constituída de 2 μL de DNA, 2,5 μL de tampão para PCR 10x (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 2,5 mM MgCl_2 , pH 8,3), 2 μL de dNTP (200 μM), 3 μL de MgCl_2 (3 mM), 0,25 μL dos *primers pefA* (0,1 μM), 0,25 μL de *Taq* DNA polimerase (2,5 U) e 15 μL de água livre de DNAase e RNAase (ultraPURE™). A amplificação foi realizada em termociclador automático (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) nos seguintes ciclos: 94°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94° por 30 seg, 50°C por 45 seg e 72°C por 1 min e um alongamento final a 72°C por 7 min. As amostras foram armazenadas à temperatura de 4°C até a análise em gel de agarose (IKUNO et al., 2006).

Para a PCR multiplex, foram utilizados os mesmos padrões da PCR simplex, com exceção das concentrações finais dos primers: 0,5 μL de *invA* (0,2 μM), 1,25 μL de *sefA* (0,5 μM) e *spvC* (0,5 μM); do volume de água (12,25 μL) e da temperatura de anelamento de 50°C para 55°C (IKUNO et al., 2006).

Os produtos gerados na PCR simplex e PCR multiplex foram submetidos à eletroforese a 80 volts por 1h, em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM e EDTA 1 mM em pH 8,0). A visualização do produto amplificado foi realizada por meio de coloração com brometo de etídio a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O gel foi observado em fotodocumentador Alpha Imager¹²²⁰ (Innotech Corp.) acoplado a um computador.

4.3 Determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

O antibiograma foi realizado pelo método de difusão em placa (BAUER et al., 1966) de acordo com as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005c). Foram utilizados discos de 15 antibióticos (OXOID): β -lactâmicos (ampicilina 10 μ g, cefoxitina 30 μ g, cefalotina 30 μ g, cefotaxima 30 μ g e imipenem 10 μ g), fenicol (cloranfenicol 30 μ g), aminoglicosídeos (amicacina 30 μ g, gentamicina 10 μ g, canamicina 30 μ g e estreptomicina 10 μ g), quinolona (ácido nalidixico 30 μ g) e fluoroquinolona (ciprofloxacina 5 μ g), tetraciclina 30 μ g, trimetoprim-sulfametoxazol 25 μ g e sulfonamidas 300 μ g.

Para realização dos testes, as cepas, mantidas em gelose conservação, foram repicadas em meio líquido infusão de cérebro coração (BHI) e incubadas a 35°C por 24h para reativação. As culturas em BHI foram semeadas em placas contendo ágar nutriente e incubadas a 35°C por 24h. A partir do ágar nutriente, colônias de cada cepa foram inoculadas em 5 mL de solução salina a 0,85%, com o auxílio de uma alça esterilizada, em quantidade suficiente para obtenção da turvação padrão 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, com auxílio de um *swab* esterilizado, o inóculo foi semeado uniformemente em placas contendo ágar Mueller Hinton. Após a absorção do inóculo, aproximadamente 3 a 5 min, os discos de antimicrobianos foram posicionados na superfície do ágar. As placas foram incubadas a 35°C por 16-18 h e em seguida realizada a leitura. Cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade.

A leitura foi realizada medindo-se o diâmetro do halo de inibição incluindo o diâmetro do disco, com o auxílio de um paquímetro. O limite final do halo de inibição foi

considerado como sendo a área sem crescimento visível a olho nu. Os diâmetros dos halos de inibição foram registrados e comparados com padrões de referência específicos para cada droga. De acordo com o diâmetro do halo, as cepas foram classificadas em sensíveis, intermediárias ou resistentes (CLSI, 2005b).

As cepas que apresentaram resistência intermediária à estreptomicina, gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina e amicacina foram submetidas ao teste de sensibilidade antimicrobiana por diluição em ágar para determinação das concentrações mínimas inibitórias (MIC) de acordo com as recomendações do CLSI (2005a). Os resultados foram interpretados de acordo com os padrões estabelecidos por DORAN et al. (2006) para estreptomicina e pelo CLSI (2005b) para os demais antibióticos. Cepa padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade.

4.4 Análise Estatística

A análise comparativa entre os resultados do perfil de susceptibilidade antimicrobiana e da pesquisa dos genes de virulência apresentados pelas cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos associados à toxinfecções alimentares em relação às aquelas não envolvidas em surtos foi realizada aplicando-se o teste t-Student, com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Cepas de *Salmonella*

As 237 cepas de *Salmonella* utilizadas no presente estudo pertenciam a 50 sorovares diferentes, assim distribuídos: S. Enteritidis (31,6%), S. Typhimurium (6,3%), S. Anatum (5,1%), S. Panama (4,6%), S. Agona (3,8%), S. Infantis (3,4%) e demais sorovares (45,2%). As cepas eram provenientes de alimentos associados ou não à toxinfecções. O sorovar Enteritidis foi identificado em 83,3% (35/42) das cepas associadas com toxinfecções e em 20,5% (40/195) das cepas não envolvidas em surtos.

Estudos epidemiológicos sugerem a entrada de S. Enteritidis no Brasil via importação de matrizes contaminadas, provavelmente no final da década de 1980 (SILVA e DUARTE, 2002), tornando-se a partir dos anos de 1990 o sorovar mais freqüentemente isolado. GEIMBA et al. (2004) relatam que entre os 75 isolados de *Salmonella* envolvidos em surtos ocorridos no Rio Grande do Sul, nos anos de 1999 e 2000, 73 (97%) foram classificados como S. Enteritidis.

A elevada freqüência do sorovar Enteritidis entre as cepas do presente estudo estão de acordo com dados reportados na literatura nacional e internacional, e reforçam a importância epidemiológica deste sorovar em nosso país, principalmente com relação às doenças transmitidas por alimentos, sendo S. Enteritidis o principal agente da salmonelose.

Quanto à categoria de alimentos da qual as cepas foram isoladas, verificamos que os produtos cárneos foram os principais veiculadores de *Salmonella*, tanto nas

amostras associadas a surtos como naquelas não associadas à toxinfecções. Além dos produtos cárneos, os ovos e as preparações a base de ovos, como a maionese e os produtos de confeitaria, estiveram entre os alimentos mais comumente implicados em surtos (Figura 1). Entretanto, os pescados e os condimentos também foram fontes importantes do patógeno, entre os alimentos não associados a surtos (Figura 2).

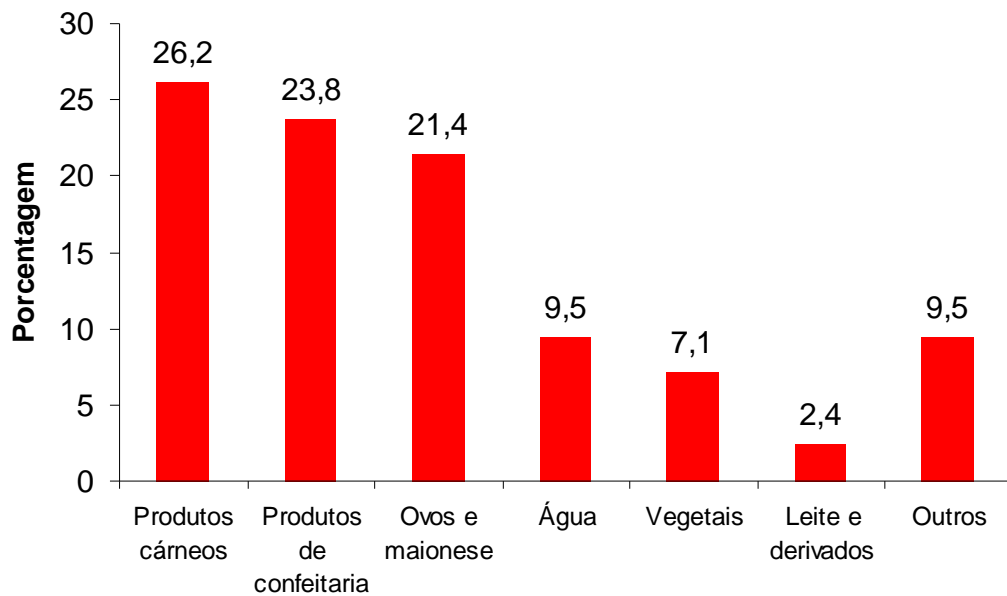


Figura 1. Distribuição das cepas de *Salmonella*, nas diferentes categorias de alimento, associadas à toxinfecções alimentares.

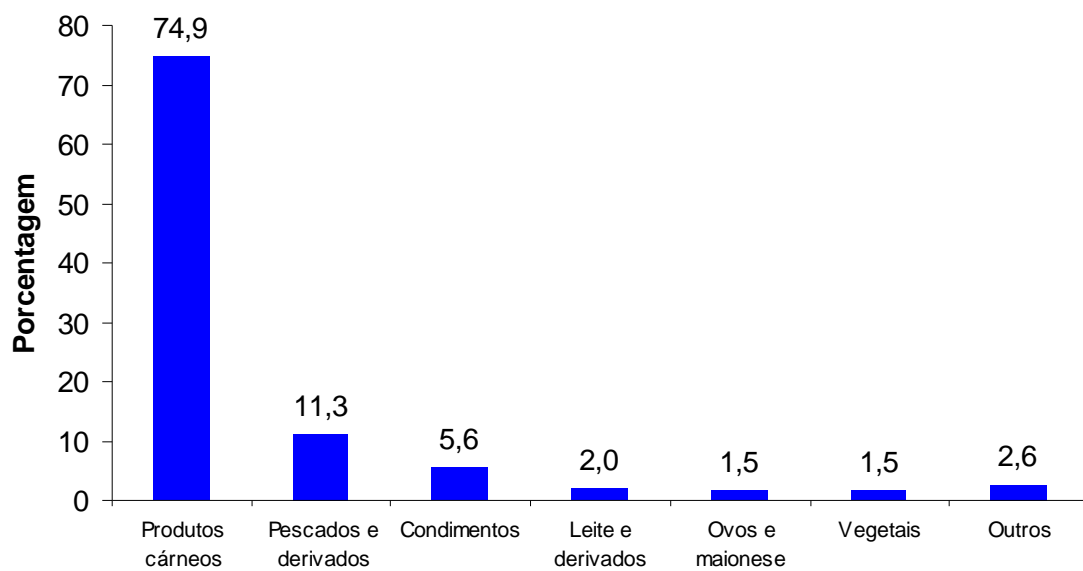


Figura 2. Distribuição das cepas de *Salmonella*, nas diferentes categorias de alimento, **não** associadas à toxinfecções alimentares

As cepas de *Salmonella* associadas à toxinfecções foram isoladas de alimentos envolvidos em 34 surtos. Não foi possível realizar um levantamento do histórico de todos os surtos, principalmente daqueles anteriores ao ano de 1998. Entretanto, algumas informações foram obtidas com relação a 18 surtos ocorridos entre 1999 e 2007 (Tabela 4). Entre os dados apresentados nos históricos, merece destaque o elevado número de atendimentos médicos e/ou hospitalizações, sendo esta ocorrência observada em 72% dos surtos. Embora a salmonelose seja, geralmente, uma doença auto-limitante, podemos observar que na maioria dos casos os indivíduos acometidos necessitaram de atendimento médico. Este fato reforça a importância da caracterização das cepas, principalmente quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, uma vez que há relatos na literatura de que a ocorrência de cepas resistentes pode estar relacionada com casos mais graves da doença e, conseqüentemente, com o aumento no número de hospitalizações (MOLBAK, 2005; VARMA et al, 2005).

Tabela 4. Histórico de 18 surtos envolvendo as cepas de *Salmonella* caracterizados no presente estudo.

Surto	ID da cepa	Produto	Local de ocorrência	Nº de afetados	Sintomas	Período de incubação	Atendimento médico
1	20	Bolo	Festa	34	febre, vômito, diarreia e cefaléia	não consta	2 hospitalizações
2	24	Sorvete	Residência	7	Não consta	Não consta	2 hospitalizações
3	28	Pudim	Restaurante	42	Febre, dor abdominal, cólicas, diarreia, vômitos e dor de cabeça	12 a 24 horas	Não consta
4	29, 31, 32, 34, 37	Feijoada, Fraldinha ao alho, Salada de tomate e mussarela, Codorna e Alcatra	Restaurante	20	Diarreia	Não consta	Não consta
5	36	Bolo	Festa	20	Cólicas intestinais, vômito e diarreia	não consta	5 hospitalizações
6	38	Bife a milanesa	Residência	3	Diarreia e vômito	Não consta	3 hospitalizações
7	42, 46	Maionese	Festa	9	Não consta	Não consta	Não consta
8	45	Filezinho	Residência	2	diarreia , ânsia de vômito, inchaço abdominal, confusão mental	8 horas	Somente atendimento medico
9	47	Maionese caseira	Ambulante	17	Cólica, diarreia, vômito e febre	15 horas	Medicadas e soro

Continua

Tabela 4. Histórico de 18 surtos envolvendo as cepas de *Salmonella* caracterizados no presente estudo - **Continuação**

Surto	ID das cepas	Produto	Local de ocorrência	Nº de afetados	Sintomas	Período de incubação	Atendimento médico
10	48	Torta de côco	Restaurante	15	diarréia, vômito, febre e dores abdominais	8 horas	10 pessoas atendimento médico e 5 hospitalizações
11	50	Salada de maionese	Residência e Clube	14	Febre, dor abdominal, vômito e diarréia aguda	6 horas	9 pessoas atendimento médico e 5 hospitalizações
12	51	Pãozinho caseiro com recheio patê frango	Residência	10	Febre, diarréia, vômito, ânsia de vômito, cólicas e dores abdominais	12 horas	10 hospitalizações
13	134	Água	Não consta	5	Cólicas abdominais, náuseas e diarréia	Não consta	Não consta
14	79	Maionese caseira	Não consta	Não consta	Não consta	Não consta	Não consta
15	80	Mousse de chocolate	Não consta	Não consta	Não consta	Não consta	Sim
16	82	Coxinha	Festa	53	Vômito, ânsia de vômito e diarréia	20 hoars	31 hospitalizações
17	83	Sonho	Residência	2	Vômito, diarréia, cólicas ou dores abdominais	Não consta	2 hospitalizações
18	99	Ovo de codorna	Restaurante	17	Febre, ânsia de vômito, diarréia, cólicas abdominais	24 horas	17 hospitalizações

5.2. Pesquisa dos genes de virulência

Os resultados da pesquisa dos genes de virulência relacionados com a produção de fimbrias (*sefA* e *pefA*), invasão (*invA*) e multiplicação intracelular (*spvC*) nas cepas isoladas de alimentos associados e não associados à ocorrência de surtos estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Distribuição dos genes de virulência entre as cepas de *Salmonella* associadas à toxinfecções alimentares.

ID	Sorovar	Genes de Virulência			
		<i>spvC</i>	<i>invA</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
1	S. Enteritidis	+	+	+	+
2	S. Enteritidis	+	+	+	+
3	S. Enteritidis	+	+	+	+
4	S. Enteritidis	+	+	+	+
5	S. Enteritidis	+	+	+	+
6	S. Enteritidis	+	+	+	+
7	S. Enteritidis	-	+	+	+
9	S. Enteritidis	+	+	+	+
10	S. Enteritidis	+	+	+	+
20	S. Enteritidis	+	+	+	+
24	S. Enteritidis	+	+	+	+
25	S. Enteritidis	-	+	+	-
26	S. Enteritidis	+	+	+	+
27	S. Enteritidis	+	+	+	+
28	S. Enteritidis	+	+	+	+
29	S. Enteritidis	+	+	+	+
31	S. Enteritidis	+	+	+	+
32	S. Enteritidis	+	+	+	+
34	S. Enteritidis	+	+	+	+
36	S. Enteritidis	+	+	+	+
37	S. Enteritidis	+	+	+	+
38	S. Enteritidis	+	+	+	+
40	S. Enteritidis	+	+	+	+
42	S. Enteritidis	+	+	+	+
45	S. Enteritidis	+	+	+	+
46	S. Enteritidis	+	+	+	+
47	S. Enteritidis	+	+	+	+
48	S. Enteritidis	+	+	+	+
49	S. Enteritidis	+	+	+	+
50	S. Enteritidis	+	+	+	+
51	S. Enteritidis	+	+	+	+
79	S. Enteritidis	+	+	+	+
80	S. Enteritidis	+	+	+	+
82	S. Enteritidis	+	+	+	+
83	S. Enteritidis	+	+	+	+
99	S. Typhimurium	+	+	-	+
101	S. Agona	-	+	-	-
134	S. Infantis	-	+	-	-
145	S. Brandenburg	-	+	-	-
197	S. Saintpaul	-	+	-	-
220	S. I 6,7:r:-	-	+	-	-
223	S. Sandiego	-	+	-	-

Tabela 6. Distribuição dos genes de virulência entre as cepas de *Salmonella* não associadas à toxinfecções alimentares.

ID	Sorovar	Genes de Virulência			
		<i>spvC</i>	<i>invA</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
8	S. Enteritidis	+	+	+	+
11	S. Enteritidis	+	+	+	+
12	S. Enteritidis	+	+	+	+
13	S. Enteritidis	+	+	+	+
14	S. Enteritidis	+	+	+	+
16	S. Enteritidis	+	+	+	+
17	S. Enteritidis	+	+	+	+
18	S. Enteritidis	+	+	+	+
21	S. Enteritidis	+	+	+	+
22	S. Enteritidis	+	+	+	+
23	S. Enteritidis	+	+	+	+
39	S. Enteritidis	+	+	+	+
43	S. Enteritidis	-	+	+	-
44	S. Enteritidis	+	+	+	+
52	S. Enteritidis	-	+	+	-
53	S. Enteritidis	+	+	+	+
54	S. Enteritidis	+	+	+	+
55	S. Enteritidis	+	+	+	+
56	S. Enteritidis	+	+	+	+
57	S. Enteritidis	+	+	+	+
58	S. Enteritidis	+	+	+	+
59	S. Enteritidis	+	+	+	+
60	S. Enteritidis	+	+	+	+
61	S. Enteritidis	+	+	+	+
63	S. Enteritidis	+	+	+	+
64	S. Enteritidis	-	+	+	+
65	S. Enteritidis	+	+	+	+
66	S. Enteritidis	+	+	+	+
67	S. Enteritidis	+	+	+	+
68	S. Enteritidis	-	+	+	+
69	S. Enteritidis	+	+	+	+
70	S. Enteritidis	-	+	+	+
71	S. Enteritidis	+	+	+	+
72	S. Enteritidis	+	+	+	+
73	S. Enteritidis	+	+	+	+
75	S. Enteritidis	+	+	+	+
76	S. Enteritidis	+	+	+	+

Continua

Tabela 6. Distribuição dos genes de virulência entre as cepas de *Salmonella* não associados à toxinfecções alimentares – **Continuação.**

ID	Sorovar	Genes de Virulência			
		<i>spvC</i>	<i>invA</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
77	S. Enteritidis	+	+	+	+
78	S. Enteritidis	+	+	+	+
81	S. Enteritidis	+	+	+	+
84	S. Typhimurium	+	+	-	-
85	S. Typhimurium	+	+	-	+
86	S. Typhimurium	+	+	-	+
87	S. Typhimurium	+	+	-	+
88	S. Typhimurium	+	+	-	+
89	S. Typhimurium	+	+	-	+
90	S. Typhimurium	-	+	-	+
91	S. Typhimurium	+	+	-	+
92	S. Typhimurium	+	+	-	+
93	S. Typhimurium	+	+	-	+
94	S. Typhimurium	-	+	-	-
95	S. Typhimurium	-	+	-	-
96	S. Typhimurium	-	+	-	-
98	S. Typhimurium	+	+	-	-
100	S. Agona	-	+	-	-
102	S. Agona	+	+	-	+
103	S. Agona	-	+	-	-
104	S. Agona	-	+	-	-
105	S. Agona	-	+	-	-
106	S. Agona	+	+	-	-
107	S. Agona	-	+	-	-
108	S. Agona	-	+	-	-
110	S. Agona	+	+	-	-
111	S. Panama	+	+	-	-
112	S. Panama	+	+	-	-
113	S. Panama	+	+	-	-
114	S. Panama	-	+	-	-
115	S. Panama	-	+	-	-
116	S. Panama	+	+	-	-
117	S. Panama	+	+	-	-
118	S. Panama	+	+	-	-
119	S. Panama	-	+	-	-
120	S. Panama	+	+	-	-
121	S. Panama	-	+	-	-
122	S. Anatum	+	+	-	-

Tabela 6. Distribuição dos genes de virulência entre as cepas de *Salmonella* não associados à toxinfecções alimentares – **Continuação.**

ID	Sorovar	Genes de Virulência			
		<i>spvC</i>	<i>invA</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
123	S. Anatum	+	+	-	-
124	S. Anatum	+	+	-	-
125	S. Anatum	-	+	-	-
126	S. Anatum	+	+	-	-
127	S. Anatum	+	+	-	-
128	S. Anatum	+	+	-	-
129	S. Anatum	+	+	-	-
130	S. Anatum	-	+	-	-
131	S. Anatum	-	+	-	+
132	S. Anatum	+	+	-	+
133	S. Anatum	+	+	-	-
135	S. Infantis	-	+	-	-
136	S. Infantis	-	+	-	-
137	S. Infantis	-	+	-	+
138	S. Infantis	-	+	-	-
139	S. Infantis	+	+	-	+
140	S. Infantis	+	+	-	+
141	S. Infantis	-	+	-	-
142	S. Infantis	+	+	-	+
143	S. Brandenburg	+	+	-	+
144	S. Brandenburg	-	+	-	-
146	S. Brandenburg	-	+	-	-
147	S. Brandenburg	-	+	-	-
148	S. Brandenburg	+	+	-	+
149	S. Brandenburg	-	+	-	-
150	S. Brandenburg	+	+	-	+
151	S. Hadar	+	+	-	+
152	S. Hadar	+	+	-	+
153	S. Hadar	-	+	-	+
154	S. Senftenberg	-	+	-	-
155	S. Senftenberg	-	+	-	-
156	S. Senftenberg	-	+	-	-
157	S. Madelia	-	+	-	-
158	S. Madelia	-	+	-	-
159	S. Madelia	-	+	-	-
160	S. Madelia	-	+	-	-
161	S. Ohio	-	+	-	-
162	S. Ohio	-	+	-	-

Tabela 6. Distribuição dos genes de virulência entre os sorovares de *Salmonella* não associados a toxinfecções alimentares – **Continuação.**

ID	Sorovar	Genes de Virulência			
		<i>spvC</i>	<i>invA</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
163	S. Ohio	-	+	-	-
164	S. Ohio	-	+	-	-
165	S. Ohio	-	+	-	-
166	S. Oranienburg	-	+	-	-
167	S. Oranienburg	-	+	-	-
168	S. Oranienburg	-	+	-	-
169	S. Oranienburg	-	+	-	-
170	S. Oranienburg	-	+	-	-
171	S. Cerro	-	+	-	-
172	S. Cerro	-	+	-	-
173	S. Schwarzengrund	-	+	-	-
174	S. Schwarzengrund	-	+	-	-
175	S. Schwarzengrund	-	+	-	-
176	S. Schwarzengrund	-	+	-	-
177	S. Schwarzengrund	-	+	-	-
178	S. Mbandaka	-	+	-	-
179	S. Mbandaka	-	+	-	-
180	S. Mbandaka	-	+	-	-
182	S. Mbandaka	-	+	-	-
183	S. Heidelberg	+	+	-	-
184	S. Heidelberg	-	+	-	-
185	S. Heidelberg	-	+	-	-
186	S. Heidelberg	-	+	-	-
187	S. Heidelberg	-	+	-	+
188	S. Heidelberg	-	+	-	-
189	S. IV 43:Z4, Z24:-	-	+	-	-
190	S. IV 43:Z4, Z24:-	-	+	-	-
191	S. I 4, 5, 12: b: -	-	+	-	-
192	S. I 4, 5, 12: i: -	-	+	-	+
193	S. I 4, 5, 12: i: -	-	+	-	+
194	S. I 4, 5, 12: i: -	-	+	-	-
195	S. I 4, 5, 12: i: -	-	+	-	-
196	S. Saintpaul	-	+	-	-
198	S. Saintpaul	-	+	-	-
199	S. Derby	-	+	-	-
200	S. Derby	-	+	-	-

Tabela 6. Distribuição dos genes de virulência entre os sorovares de *Salmonella* não associados a toxinfecções alimentares – **Continuação.**

ID	Sorovar	Genes de Virulência			
		<i>spvC</i>	<i>invA</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
201	S. Derby	-	+	-	-
202	S. Glostrup	-	+	-	-
203	S. Glostrup	-	+	-	-
204	S. Javiana	-	+	-	-
205	S. enterica 3, 10: Z: -	-	+	-	-
206	S. Give	-	+	-	-
207	S. Give	-	+	-	-
208	S. Emek	-	+	-	-
209	S. Bredeney	-	+	-	-
210	S. Bredeney	+	+	-	-
211	S. Bredeney	+	+	-	+
212	S. Bredeney	-	+	-	+
213	S. Bredeney	+	+	-	+
214	S. Bredeney	+	+	-	+
215	S. Bredeney	+	+	-	+
216	S. Muenchen	-	+	-	-
217	S. I 4, 12: i:-	-	+	-	-
218	S. I 4, 12: i:-	+	+	-	+
219	S. I 6,7:r:-	+	+	-	+
221	S. I 6,7:r:-	-	+	-	-
222	S. I 6,7:r:-	-	+	-	-
224	S. Sandiego	-	+	-	-
225	S. Sandiego	-	+	-	-
226	S. Sandiego	-	+	-	-
228	S. London	-	+	-	-
229	S. London	-	+	-	-
230	S. London	-	+	-	-
231	S. Saphra	-	+	-	-
232	S. Levingstone	-	+	-	-
233	S. I 6, 8: E, H: -	-	+	-	-
234	S. Lexington	-	+	-	-
235	S. Brandenlsing	-	+	-	-
236	S. Berta	-	+	-	-
237	S. Poona	-	+	-	-
238	S. I 3, 10: - :1,6	-	+	-	-
239	S. Abaetetuba	-	+	-	-
240	S. I 13, 23: Z: -	-	+	-	-
241	S. I 6,8:Z10:-	-	+	-	-

Tabela 6. Distribuição dos genes de virulência entre os sorovares de *Salmonella* não associados a toxinfecções alimentares – **Continuação.**

ID	Sorovar	Genes de Virulência			
		<i>spvC</i>	<i>invA</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
242	S. Rubislaw	-	+	-	-
243	S. Rubislaw	-	+	-	-
244	S. Tennessee	-	+	-	-
245	S. enterica 1,4, 5, 12	-	+	-	-
246	S. enterica 1,4, 5, 12	-	+	-	-
247	S. Newport	-	+	-	-
248	S. Paratyphi B	-	+	-	-
249	S. Pomona	-	+	-	-

ID: Identificação

O gene de virulência *invA* foi detectado em todas as cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções. Estes resultados estão de acordo com outros estudos (OLAH et al., 2005; LI et al, 2006; SKIBERG et al., 2006; NDE e LOGUE, 2008), confirmando a ampla disseminação deste gene em *Salmonella*. O *invA* faz parte de um grupo de genes envolvidos na invasão celular e está presente em uma região conservada do genoma de *Salmonella* (GALAN e CURTISS, 1991; STONE et al., 1994; SWAMY et al., 1996). O gene *invA* é constituído por seqüências presentes, exclusivamente em *Salmonella*, permitindo a sua utilização na identificação do patógeno em amostras de origem humana e animal (SANTOS et al., 2001).

Com relação aos outros genes estudados, o gene *spvC* foi encontrado em 80,9% (34/42) das cepas envolvidas em toxinfecções alimentares e em 41% (80/195) das cepas não associadas à toxinfecções. Quanto à distribuição do gene de acordo com os sorovares, verificamos que o mesmo foi detectado em *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Panama*, *S. Anatum*, *S. Infantis*, *S. Branderburg*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Bredeney*, *S. enterica* | 4,12:i:- e *S. enterica* | 6,7:r:- (Tabelas 7 e 8).

O operon *spv*, constituído pelo gene regulador *spvR* e pelos genes estruturais *spvABCD*, está localizado em plasmídeos de virulência que estão presentes, freqüentemente, nos sorovares Abortusovis, Choleraesuis, Dublin, Enteritidis, Gallinarum, Pullorum e Typhimurium e, geralmente, ausentes em outros sorovares como Typhi, Paratyphi, Hadar e Infantis (RYCHLIK et al., 2006). Esta característica justifica as diferenças observadas nas porcentagens de cepas positivas para este gene entre os dois grupos estudados (associados e não associados à toxinfecções). Podemos observar que nas amostras associadas a surtos, os sorovares que comumente apresentam plasmídeos (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) representam aproximadamente 86% do total de cepas analisadas, enquanto que naquelas não envolvidas em surtos, estes sorovares representam apenas 27,7% dos isolados. Neste estudo, também foi possível à detecção do gene em sorovares que geralmente não apresentam plasmídeos, diferente do que foi observado por OLAH et al (2005) que não detectou o gene *spvC* em 94 isolados distribuídos entre os sorovares Agona, Hadar, Heidelberg, Istanbul, Muenchen, Newport, Reading e Senftenberg.

Os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8 mostram uma alta prevalência do gene *spvC* em *S. Enteritidis*. Estes dados estão de acordo com outros estudos realizados. OLIVEIRA et al. (2003) detectaram o gene *spvC* em 90,2% das cepas isoladas de alimentos, aves, suínos e de amostras clínicas. CASTILLA et al. (2006) verificaram a presença do gene *spvC* em 92,8% dos isolados de aves. Em um estudo realizado por SOTO et al. (2006), o gene *spvC* estava presente em 95% das cepas de *S. Enteritidis* isoladas de pacientes com bacteremia e gastroenterite. Entre as cepas que não apresentaram o gene, duas não continham plasmídeo e as outras duas apresentavam um plasmídeo de 40 kb.

O gene *sefA* foi detectado em 83,3% (35/42) das cepas associadas à toxinfecções e em 20,5% (40/195) das cepas não associadas a surtos, estando presente somente em isolados de *S. Enteritidis* (tabela 7 e 8). Estes resultados eram esperados, uma vez que os genes do operon *sef* (*sefABCD*) são restritos aos sorovares do sorogrupo D, que incluem *S. Enteritidis*, *S. Typhi*, *S. Dublin*, *S. Berta*, *S. Gallinarum* e outros (DORAN ET AL., 1996). No presente estudo todos os isolados de *S. Enteritidis* apresentaram o gene *sefA*. Devido a esta especificidade, este gene vem sendo utilizado na identificação de *Salmonella Enteritidis* (SEO et al., 2004; CORTEZ et al., 2006) e na produção de vacinas para aves (LOPES et al, 2006). Uma outra característica importante relacionada com a presença deste gene em *S. Enteritidis*, é que o mesmo codifica a produção da fimbria SEF14 considerada fundamental para aderência da bactéria nos tecidos reprodutivos das aves (THIAGARAJAN et al, 1996), contribuindo assim para a persistência e disseminação deste patógeno na produção animal.

O gene *pefA* estava presente em 83,3% (35/42) dos isolados associados a toxinfecções e em 35,9% (70/195) dos isolados não envolvidos em surtos. Este gene foi detectado em isolados de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Infantis*, *S. Branderburg*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. enterica* | 4, 5, 12:i:-, *S. Bredeney*, *S. enterica* | 4,12:i:- e *S. enterica* | 6,7:r:- (Tabelas 7 e 8).

Assim como o gene *spvC*, o *pefA* também está localizado em plasmídeos de virulência, sendo a sua presença limitada a determinados sorovares. Os resultados do presente estudo mostraram uma maior prevalência deste gene entre as cepas quando comparados a outros estudos. LI et al. (2006) não detectaram o gene *pefA* entre os 17 isolados de *S. Hadar* estudados. SKYBERG et al. (2006) avaliaram 158 isolados de *Salmonella* de diferentes sorovares e detectaram o gene em apenas 17% dos isolados.

No estudo realizado por NDE e LOGUE (2008) com diferentes sorovares, o gene estava presente somente em 22,5 % das cepas. Os valores encontrados no presente estudo podem estar relacionados com a elevada proporção de *Salmonella* Enteritidis que apresentaram o gene *pefA*, 97,1% das cepas envolvidas em surtos e 95% naqueles não associados, estando estes resultados de acordo com as observações de CASTILHA et al. (2006) que detectaram o gene em 97,3% das cepas de *S. Enteritidis*.

A análise dos resultados para os genes *spvC* e *pefA*, permite verificar que os mesmos estavam presentes ou ausentes, simultaneamente, na maioria dos isolados. Entre os 42 isolados envolvidos em surtos, 34 (80,9%) apresentaram simultaneamente os genes *spvC* e *pefA* e sete (16,6%) não apresentaram nenhum dos dois genes estudados. Entre os 195 isolados não associados a surtos, 61 (31,3%) foram positivos para ambos os genes e em 103 (52,8%) os genes não foram detectados. Estes resultados podem explicados pelo fato dos genes *spvC* e *pefA* serem carreados, freqüentemente, pelo mesmo plasmídeo (HANEDA et al, 2001; RYCHLIK et al, 2006).

As cepas utilizadas neste estudo foram isoladas de alimentos envolvidos em 34 surtos diferentes. Em três surtos, *Salmonella* Enteritidis foi isolada de mais de um alimento, sendo que em um dos surtos as cepas apresentaram perfis diferentes. Os alimentos envolvidos no surto foram alface e peito de frango. A cepa de *S. Enteritidis* isolada da alface (n° 25) não apresentou os genes *spvC* e *pefA*, enquanto que a cepa isolada do peito de frango (n° 26) apresentou esses dois genes.

Vale ressaltar que embora os operons *spv* e *pef* estejam associados a determinados sorovares, nem todos os isolados do mesmo sorovar irão, necessariamente, apresentá-los (ROTGER e CASADESUS, 1999), como observado neste estudo.

Tabela 7. Prevalência dos genes *spvC*, *sefA* e *pefA* entre os sorovares de *Salmonella* isolados de alimentos associados à toxinfecções alimentares.

Sorovar	N° de cepas	N° de cepas positivas		
		<i>spvC</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
S. Enteritidis	(35)	33 (94,3%)	35 (100%)	34 (97,1%)
S. Typhimurium	1	1 (100%)	0	1 (100%)

Tabela 8. Prevalência dos genes *spvC*, *sefA* e *pefA* entre os sorovares de *Salmonella* isolados de alimentos não associados à toxinfecções alimentares.

Sorovar	N° de cepas	N° de cepas positivas		
		<i>spvC</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
S. Enteritidis	40	35 (87,5%)	40 (100%)	38 (95%)
S. Typhimurium	14	10 (71,4%)	0	9 (64,3%)
S. Agona	9	3 (33,3%)	0	1 (11,1%)
S. Panama	11	7 (63,6%)	0	0
S. Anatum	12	9 (75%)	0	2 (16,7%)
S. Infantis	8	3 (37,5%)	0	4 (50%)
S. Brandenburg	7	3 (42,8%)	0	3 (42,8%)
S. Hadar	3	2 (66,7%)	0	3 (100%)
S. Heidelberg	6	1 (16,7%)	0	1 (16,7%)
S. <i>enterica</i> I 4, 5, 12:i:-	4	0	0	2 (50%)
S. Bredeney	7	5 (71,4%)	0	5 (71,4%)
S. <i>enterica</i> I 4,12:i:-	2	1 (50%)	0	1 (50%)
S. <i>enterica</i> I 6,7:r:-	4	1 (25%)	0	1 (25%)

A comparação entre os resultados apresentados por *S. Enteritidis* isoladas de amostras envolvidas em surtos com aquelas não envolvidas em surtos permite verificar que todas as cepas apresentaram os genes *invA* e *sefA*. Quanto aos genes *spvC* e *pefA*, as prevalências nas cepas associadas (94,3% e 97,1%, respectivamente) e não

associadas à surtos (87,5% e 95%, respectivamente) foram muito semelhantes, não havendo diferença significativa ($p>0,05$) entre os resultados, demonstrando a ampla disseminação desses genes em *S. Enteritidis*, independente de estarem ou não envolvidas em surtos. Em relação a esses quatro genes, as cepas de *S. Enteritidis* foram classificadas em três perfis (Tabela 9), com predominância do perfil P1.

Tabela 9. Perfil de virulência das cepas de *Salmonella* Enteritidis associadas ou não a toxinfecções alimentares.

Perfil	N° de isolados		Genes			
	Associados a surtos	Não associados a surtos	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	<i>sefA</i>	<i>pefA</i>
P1	33 (94,3%)	35 (87,5%)	+	+	+	+
P2	1 (2,8%)	2 (5%)	-	+	+	+
P3	1 (2,8%)	3 (7,5%)	-	+	+	-

5.3. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana apresentado pelas 237 cepas de *Salmonella* estudadas, mostrou que 111 (46,8%) foram sensíveis a todos os agentes antimicrobianos testados, 123 (51,9%) resistentes à pelo menos uma droga e 3 (1,3%) cepas apresentaram apenas resistência intermediária. O número de cepas analisadas e que apresentaram resistência, de acordo com o ano de isolamento, estão representados na Figura 3.

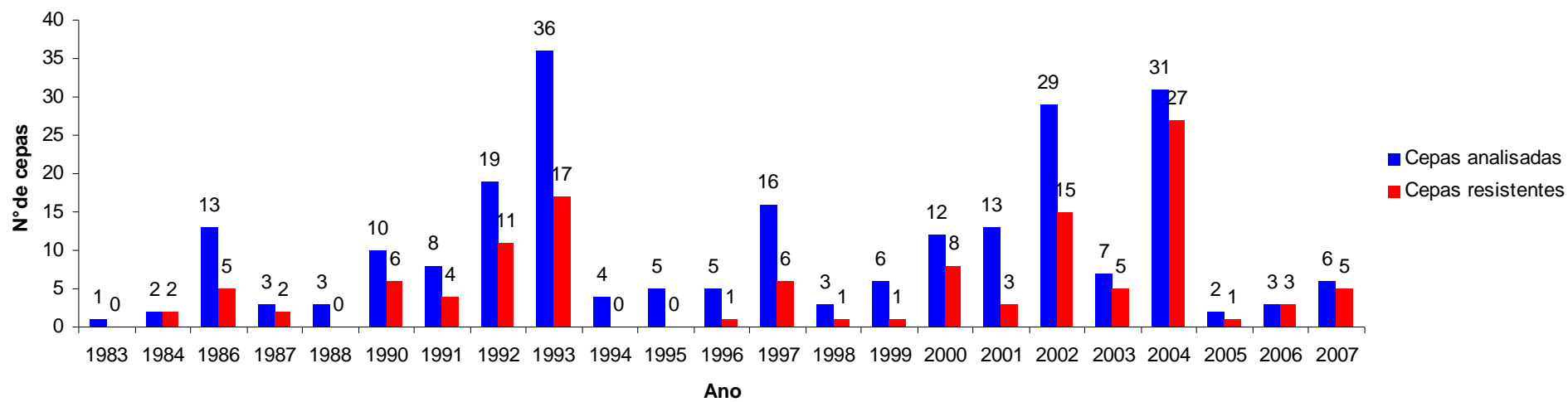


Figura 3. Distribuição do número de cepas analisadas e que apresentaram resistência de acordo com o ano de isolamento.

Com relação às 42 cepas associadas a surtos, 28 (66,7%) foram sensíveis a todos os antibióticos e 14 (33,3%) apresentaram resistência à pelo menos uma droga. Multi-resistência (dois ou mais antibióticos) foi observada em cinco (11,9%) cepas.

Entre as 195 cepas não envolvidas em surtos, 83 (42,6%) apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos, 109 (55,9%) foram resistentes a um ou mais antibióticos e três (1,5%) apresentaram apenas resistência intermediária. Um total de 20 (10,2%) cepas apresentou multi-resistência. No total foram identificados 14 perfis de resistência antimicrobiana (Tabela 10).

Os perfis de resistência, observados para cada sorovar, estão apresentados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 10. Perfil de resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. isoladas de alimentos associados ou não a toxinfecções alimentares.

Perfil	Associadas à toxinfecções	Não associadas à toxinfecções
STR	2 (4,8%)	57 (29,2%)
NAL	7 (16,7%)	28 (14,3%)
TET	--	3 (1,5%)
AMP	--	1 (0,5%)
GEN+STR	1 (2,4%)	5 (2,6%)
GEN+KAN	--	1 (0,5%)
TET+STR	--	6 (3,1%)
SSS+STR	--	2 (1,0%)
GEN+KAN+STR	1(2,4%)	--
GEN+NAL+STR	2 (4,8%)	1 (0,5%)
TET+SSS+STR	--	2 (1,0%)
TET+KAN+STR	--	1 (0,5%)
TET+NAL+CHL+STR	--	2 (1,0%)
AMP+STX+SSS+STR	1 (2,4%)	--
Total	14 (33,3%)	109 (55,9%)

AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CHL, cloranfenicol; TET, tetraciclina; AK, amicacina; GEN, gentamicina; STX, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; NAL, ácido nalidixico; IPM, imipenem; KAN, canamicina; SSS, sulfonamidas; STR, estreptomicina.

Tabela 11. Perfil de resistência antimicrobiana entre os diferentes sorovares de *Salmonella* isolados de alimentos associados à toxinfecções alimentares.

Sorovar	Perfil de Resistência	Nº de isolados em cada perfil
S. Enteritidis	NAL	7
S. Enteritidis	GEN+STR	1
S. Enteritidis	GEN+KAN+STR	1
S. Enteritidis	GEN+NAL+STR	2
S. Typhimurium	AMP+STX+SSS+STR	1
S. Infantis	STR	1
S. Saintpaul	STR	1
Total		14

AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CHL, cloranfenicol; TET, tetraciclina; AK, amicacina; GEN, gentamicina; STX, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; NAL, ácido nalidixico; IPM, imipenem; KAN, canamicina; SSS, sulfonamidas; STR, estreptomicina

Tabela 12. Perfil de resistência antimicrobiana entre os diferentes sorovares de *Salmonella* isolados de alimentos **não** associados à toxinfecções alimentares.

Sorovar	Perfil de Resistência	Nº de isolados em cada perfil
S. Enteritidis	NAL	27
S. Enteritidis	STR	1
S. Enteritidis	(SSS) ^a	1
S. Enteritidis	GEN+STR	4
S. Enteritidis	GEN+NAL+STR	1
S. Typhimurium	STR	5
S. Typhimurium	STR+(KAN) ^a	1
S. Typhimurium	GEN+STR	1
S. Typhimurium	GEN+KAN	1
S. Typhimurium	TET+SSS+STR	1
S. Typhimurium	TET+NAL+CHL+STR	2
S. Agona	STR	4
S. Panama	STR	1
S. Anatum	STR	6
S. Infantis	STR	5
S. Infantis	NAL	1
S. Infantis	STR+(KAN) ^a	1
S. Branderburg	STR	2
S. Branderburg	TET+STR	1
S. Hadar	TET+STR	1
S. Hadar	TET+KAN+STR	1
S. Senftenberg	STR	2
S. Madelia	STR	1
S. Ohio	STR	2
S. Oranienburg	STR	1
S. Oranienburg	(CEF) ^a +(TET) ^a +STR	1
S. Cerro	STR	1
S. Schwarzengrund	STR	2
S. Heidelberg	STR	2

Continua

Tabela 12. Perfil de resistência antimicrobiana entre os diferentes sorovares de *Salmonella* isolados de alimentos **não** associados à toxinfecções alimentares – Continuação.

Sorovar	Perfil de Resistência	Nº de isolados em cada perfil
S. Heidelberg	TET	1
S. IV 43:Z4, Z24:-	STR	2
S. I 4, 5, 12: i: -	STR	1
S. I 4, 5, 12: i: -	TET	1
S. I 4, 5, 12: i: -	TET+STR	2
S. Saintpaul	AMP	1
S. Derby	STR	1
S. Derby	TET+SSS+STR	1
S. Glostrup	STR	1
S. enterica 3, 10: Z: -	STR	1
S. Give	STR	1
S. Emek	(SSS) ^a	1
S. Bredeney	TET	1
S. Bredeney	STR+(KAN) ^a	1
S. Bredeney	TET+STR	1
S. I 4, 12: i:-	SSS+STR	2
S. I 6,7:r:-	STR	2
S. I 6,7:r:-	STR+(KAN) ^a	1
S. London	STR	1
S. Levingstone	(SSS) ^a	1
S. Lexington	STR	1
S. Berta	STR	1
S. Poona	STR	1
S. Abraetetuba	STR	1
S. I 6,8:Z10:-	TET+STR	1
S. enterica 1,4, 5, 12	STR	2
S. Paratyphi B	STR	1
Total		112*

*Três cepas apresentaram apenas resistência intermediária.

^a Resistência intermediária

Levantamentos realizados em diversos países mostram um aumento significativo no número de isolados de *Salmonella* resistentes nos últimos anos. No início dos anos de 1990 a frequência de cepas resistentes permanecia entre 20 e 30%, no entanto valores superiores a 70% já foram relatados no início deste século. Alguns estudos mostram taxas de resistência superiores aos resultados apresentados no presente estudo, enquanto outros revelam níveis de resistência inferiores (SU et al., 2004; ANTUNES et al., 2006; TEIXEIRA, 2006; ZHAO et al., 2006; ANVISA, 2008). Entretanto, diversos fatores devem ser considerados ao compararmos os resultados com aqueles obtidos por outros autores, como diferenças nas fontes de isolamento das cepas, localização geográfica, período avaliado, drogas antimicrobianas utilizadas e técnicas empregadas para determinação da resistência antimicrobiana (OLIVEIRA et al., 2005).

As taxas de resistência variam também entre os diferentes sorovares de *Salmonella*, sendo *S. Enteritidis* relativamente mais susceptível e *S. Typhimurium* o sorovar com maiores taxas de resistência (SU et al., 2004). No presente estudo, entre os seis sorovares mais frequentes, as maiores taxas de resistências foram observadas em *S. Infantis* (88,9%), *S. Typhimurium* (80%) e *S. Enteritidis* (58,7%). *S. Anatum*, *S. Agona* e *S. Panama* apresentaram taxas de resistência de 50%, 40% e 9,1%, respectivamente.

Com relação às cepas de *S. Enteritidis*, sorovar com maior prevalência em nosso país, 31,4% (11/35) das cepas envolvidas em surtos foram resistentes a uma ou mais drogas e 82,5% (33/40) das cepas não envolvidas em surtos apresentaram resistência. A diferença significativa ($p < 0,05$) observada pode estar relacionada com a categoria de alimento da qual as cepas resistentes foram isoladas. Entre as cepas não

associadas a surtos, 81,8% foram isoladas de frango e derivados, enquanto que entre as cepas envolvidas em surtos apenas 21,4% eram provenientes de carne de aves e produtos derivados.

Embora a resistência antimicrobiana em *S. Enteritidis* seja considerada baixa quando comparada com outros sorovares, cepas de *S. Enteritidis* resistentes têm sido isoladas com frequência de amostras clínicas de humanos e de alimentos, principalmente em isolados de carne de aves. THRELFALL et al. (2006) relatam que a incidência de cepas de *S. Enteritidis* resistentes em amostras de origem humana aumentou de 19% em 2000 para 39% em 2004, no Reino Unido e País de Gales.

No Brasil, OLIVEIRA et al. (2006) avaliaram 79 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos diversos, envolvidos em surtos, e encontraram resultados similares aos do presente estudo, 37,9% dos isolados foram resistentes. FERNADES et al. (2003) também relatam a ocorrência de resistência em 33,3% das 105 cepas de *S. Enteritidis*, isoladas de amostras clínicas humanas e de alimentos (a maioria produtos a base de ovos). Por outro lado, índices elevados foram obtidos por OLIVEIRA et al. (2005) que avaliaram o perfil de resistência de cepas de *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango, material avícola (vísceras e *swab* do ambiente), alimentos envolvidos em surtos e de amostras de origem humana, e verificaram que 90,1% dos isolados foram resistentes à pelo menos uma droga, sendo que as maiores taxas de resistência foram observadas entre os isolados provenientes de material avícola. CARDOSO et al. (2006) relatam a ocorrência de resistência em todas as 80 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango, no período de 1995 e 1996.

Outros dados reportados na literatura nacional confirmam a elevada taxa de resistência em cepas de *Salmonella* isoladas de carne de aves e derivados. No Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e Resistência Bacteriana em Frango, coordenado pela ANVISA, foram isoladas 250 cepas de *Salmonella* de carcaças de frango, pertencentes a 18 sorovares diferentes, sendo que todas (100%) as cepas apresentaram resistência a uma ou mais drogas (ANVISA, 2008). TEIXEIRA (2006) avaliou a resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango convencionais e alternativas (sem o emprego de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento) e relata a ocorrência de resistência em 96,8% (62/64) das cepas isoladas, sendo que as cepas de *Salmonella* oriundas de frangos alternativos mostraram uma tendência de menor resistência aos antimicrobianos testados quando comparadas à dos convencionais. Nestes dois estudos, *S. Enteritidis* foi o sorovar mais prevalente.

Estudo realizado por VAZ (2007) também aponta uma maior frequência de resistência em cepas de *S. Enteritidis* isoladas de frango e fontes relacionadas do que em cepas de outras origens, coletadas no Estado do Rio Grande do Sul, no período de 1995 a 2003. Entre as 53 cepas isoladas de frango e fontes relacionadas, 69,1% foram resistentes a uma ou mais drogas, enquanto que apenas 28,57% (4/14) dos isolados de origem humana e 44,83% (13/29) das cepas envolvidas em surtos apresentaram resistência antimicrobiana.

Com relação aos antibióticos utilizados no presente estudo, não foram detectadas cepas resistentes a cefoxitina, cefalotina, cefotaxima, amicacina, ciprofloxacina e imipenem, tanto nos alimentos envolvidos em surtos como naqueles não associados a toxinfecções. De maneira geral, sem considerarmos a origem das cepas (associadas ou não associadas a surtos), as maiores taxas de resistência foram observadas para estreptomicina (35,9%), ácido nalidíxico (16,9%), tetraciclina (5,9%) e gentamicina (4,6%).

Entre as cepas envolvidas em toxinfecções, as maiores taxas de resistência foram observadas para ácido nalidíxico, estreptomicina e gentamicina. Para canamicina, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol e sulfonamida, as taxas foram de 2,4%. Entre as cepas não relacionadas a surtos, a estreptomicina, o ácido nalidíxico, a tetraciclina e a gentamicina foram os antibióticos mais comumente associados com resistência. Também foram observadas cepas com resistência a sulfonamida, cloranfenicol, canamicina e ampicilina (Tabela 13).

Quanto aos resultados para *S. Enteritidis*, somente foram detectadas cepas resistentes para estreptomicina, ácido nalidíxico e gentamicina. Apenas uma cepa, isolada de alimento envolvido em toxinfecção alimentar, apresentou resistência intermediária a sulfonamida.

Tabela 13. Número e porcentagem de cepas resistentes isoladas de alimentos associados ou não a toxinfecções alimentares.

ATB	Associadas a toxinfecções		Não associadas a toxinfecções		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
AMP	1	2,4	1	0,5	2	0,8
FOX	--	--	--	--	--	--
CEF	--	--	--	--	--	--
CTX	--	--	--	--	--	--
CHL	--	--	2	1,0	2	0,8
TET	--	--	14	7,2	14	5,9
AK	--	--	--	--	--	--
GEN	4	9,5	7	3,6	11	4,6
STX	1	2,4	--	--	1	0,4
CIP	--	--	--	--	--	--
NAL	9	21,4	31	15,9	40	16,9
IPM	--	--	--	--	--	--
KAN	1	2,4	2	1,0	3	1,3
SSS	1	2,4	4	2,0	5	2,1
STR	7	16,7	78	40	85	35,9

AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CHL, cloranfenicol; TET, tetraciclina; AK, amicacina; GEN, gentamicina; STX, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; NAL, ácido nalidixico; IPM, imipenem; KAN, canamicina; SSS, sulfonamidas; STR, estreptomicina.

Embora a estreptomicina não seja utilizada no tratamento das salmoneloses humanas, o teste de sensibilidade a este agente antimicrobiano é amplamente aplicado na detecção de marcadores epidemiológicos. A resistência à estreptomicina faz parte, por exemplo, do fenótipo característico de penta-resistência associado com *S. Typhimurium* DT104 (resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina) (DORAN et al., 2006).

Em relação ao percentual de resistência para estreptomicina (35,9%), observado neste estudo, resultados similares foram relatados por diversos autores (ZHAO et al., 2006; VALDEZATE et al., 2007; THAKUR et al., 2007; NDE e LOGUE, 2008). Entretanto, índices superiores foram relatados no PREBAF (ANVISA, 2008) em que 89,3% das cepas isoladas de carcaças de frango foram resistentes a este antibiótico. A resistência à estreptomicina tem sido observada em diferentes sorovares de *Salmonella* isolados no Brasil, como Enteritidis (OLIVEIRA et al., 2006), Typhimurium (GHILARDI et al., 2006; BESSA et al, 2007), Hadar (RIBEIRO et al., 2006) e Derby (MICHAEL et al, 2006). No presente estudo, a resistência à estreptomicina foi observada em 33 diferentes sorovares. Quanto a *S. Enteritidis*, 11,4% das cepas associadas a surtos e 15% das cepas não envolvidas em toxinfecções apresentaram resistência para este antibiótico, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre as taxas de resistência. Estes resultados estão de acordo com os apresentados por OLIVEIRA et al. (2006) em que 11,4% das cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos foram resistentes para estreptomicina. Por outro lado, em estudo realizado por OLIVEIRA et al. (2005) apenas 3,8% das cepas, isoladas de carcaças de frango e alimentos, apresentam resistência a esta droga.

Alguns estudos relatam a ocorrência de um perfil de resistência à estreptomicina associado à tetraciclina (ANTUNES et al., 2003; NDE e LOGUE et al., 2008). No presente estudo, entre as 85 cepas resistentes à estreptomicina, apenas 11(12,9%) apresentaram também resistência à tetraciclina.

É interessante notar que a resistência à estreptomicina ao longo dos anos de isolamento das cepas, avaliadas neste estudo, foi constante, diferente do observado para os outros antibióticos (Tabela 14). Segundo PEIRANO et al. (2006) esta persistência pode estar relacionada a uma co-seleção, uma vez que o uso terapêutico da estreptomicina tanto na medicina humana como veterinária tem diminuído.

Níveis mais elevados de resistência também foram observados para o ácido nalidixico (16,9%), principalmente entre as cepas de *S. Enteritidis*. Cepas de *S. Typhimurium* e *S. Infantis* também apresentaram resistência a esta droga. Entre as cepas de *S. Enteritidis* não associadas a surtos, 70% foram resistentes a este antibiótico, enquanto apenas 25,7% das cepas envolvidas em toxinfecções apresentaram este fenótipo. Essa diferença significativa ($p < 0,05$) pode estar relacionada com a maior proporção de cepas, não associadas a toxinfecções, isoladas de carne de aves. Alguns estudos mostram elevada frequência de cepas resistentes ao ácido nalidixico em carne de aves e derivados no Brasil (ANVISA, 2008; TEIXEIRA, 2006).

Em vários países, incluindo o Brasil, as quinolonas e fluoroquinolonas são extensivamente utilizadas como drogas terapêuticas na avicultura. Na Europa, a incidência de cepas de *Salmonella* resistentes as quinolonas teve um aumento significativo nos anos seguintes à liberação das fluoquinolonas, como a enrofloxacin, para uso veterinário (MALORNY et al., 1999). De acordo com GIRAUD et al. (1999), o uso de enrofloxacin pode selecionar cepas mutantes de *Salmonella* resistentes ao

ácido nalidíxico e a outras fluoroquinolonas, incluindo a ciprofloxacina. Segundo SILVA e DUARTE (2002) o uso extensivo de quinolonas em aves, no Brasil, tem sido facilitado por uma legislação flexível, pelo aparecimento de genéricos, com menor custo, para uso em ração e água e pela sua eficácia contra as salmonelas.

No presente estudo, cepas resistentes ao ácido nalidíxico foram detectadas, principalmente, a partir do ano de 2000. Antes deste período, apenas uma cepa, isolada em 1993, apresentou resistência a este antibiótico (Tabela 14). Na Europa, a ocorrência de resistência ao ácido nalidíxico em cepas de *S. Enteritidis* de origem humana quase triplicou entre os anos de 2000 e 2004, passando de 10% para 26% (MEAKINS et al., 2008). Em 96 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos na Espanha, em 2002, 40,6 % foram resistentes ao ácido nalidíxico (VALDEZATE et al., 2007).

No Brasil, estudo realizado por FERNANDES et al (2003) com 105 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em diferentes regiões do Estado de São Paulo, no período de 1975 a 1995, mostrou que apenas 3,0% cepas de origem humana e 6,0% das cepas de origem não humana apresentaram resistência ao ácido nalidíxico. Resultados similares foram relatados por OLIVEIRA et al (2005), que avaliaram 31 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Rio Grande do Sul, durante os anos de 1995 a 1997, e verificaram que apenas 3,2% das cepas foram resistentes ao ácido nalidíxico. Porém, um outro estudo realizado por OLIVEIRA et al (2006) com 79 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de surtos ocorridos nesta mesma região, durante 2001 e 2002, revelou índices superiores de resistência (21,5%), sendo este resultado similar ao obtido em nosso estudo entre as cepas associadas a surtos. Os autores relatam, ainda, um aumento nos índices, de 19% em 2001 para 24,3% em 2002.

O aumento da resistência ao ácido nalidíxico gera preocupação, pois as fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, estão entre as drogas mais comumente utilizadas para tratamento de salmonelose invasiva em adultos, e já foram reportados casos de falhas no tratamento em pacientes acometidos por infecções causadas por cepas de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico (MOLBAK et al., 1999; HAKANEN et al., 2001). Além disso, cepas resistentes a esta droga estariam associadas com infecções mais severas (VARMA et al., 2005). Segundo ANGULO et al. (2004), o uso de fluoroquinolonas na medicina veterinária contribui para a emergência e disseminação de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico entre os produtos de origem animal, as quais podem ser transmitidas ao homem. A ocorrência de cepas de *Campylobacter* resistentes as fluoroquinolonas, assim como outros dados reportados na literatura contribuíram para a decisão do FDA em suspender o uso de fluoroquinolonas na criação de frangos e perus. Desde setembro de 2005, o uso de fluoroquinolonas na produção de aves é considerado ilegal nos EUA (FDA, 2005a).

Embora o uso da tetraciclina como promotor de crescimento esteja proibido em nosso país desde 1998, este antimicrobiano tem sido uma das drogas mais utilizadas terapeuticamente na produção animal (OLIVEIRA et al. 2005) contribuindo, conseqüentemente, para a ocorrência de níveis elevados de resistência para este antimicrobiano. No entanto, no presente estudo, apenas 14 cepas não associadas a surtos apresentaram resistência a este antibiótico, representando 5,9% do total de cepas analisadas, sendo que oito cepas foram isoladas em anos anteriores ao da proibição e seis isoladas em 2002 (Tabela 14). Estes resultados diferem daqueles observados em outros estudos em que foram detectadas taxas de resistência mais elevadas. De acordo com THAKUR et al (2007), entre as 400 cepas de *Salmonella*

isoladas de fezes e carcaças de suínos, a maior taxa de resistência foi obtida para tetraciclina (78,5%). Em estudo realizado por VESSONI (2003), 62,7% das cepas isoladas de carcaças de frango foram resistentes a esta droga. No Reino Unido, 67,5% das cepas de *Salmonella* isoladas de produtos cárneos, coletados no comércio no período de 2003 a 2005, foram resistentes à tetraciclina (LITTLE et al., 2008).

Resistência à tetraciclina foi observada nos sorovares Typhimurium, Bradenburg, Hadar, I 4, 5, 12: i:-, Derby, Bredeney e I 6,8: Z10:-. Não foram detectadas cepas de *S. Enteritidis* resistentes à tetraciclina, diferente do resultado apresentado por CARDOSO et al. (2006) que relataram que 100% das 80 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango, entre 1995 e 1996, foram resistentes a este agente antimicrobiano. Entretanto, freqüências menores foram observadas por OLIVEIRA et al. (2005) em cepas de *S. Enteritidis* isoladas de fontes diversas (15,2%) e por VAZ (2007) em que apenas uma cepa de origem humana apresentou esse fenótipo entre as 96 cepas avaliadas.

A freqüência de resistência para gentamicina foi de 4,6% do total de cepas avaliadas. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos índices de resistência, para este antibiótico, entre as cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos (11,4%) em relação àquelas não associadas a surtos (12,5%). Resultados similares para *S. Enteritidis* foram obtidos por TEIXEIRA (2006) em cepas isoladas de carcaças de frango (14,3%) e OLIVEIRA et al (2006) em isolados de amostras de alimentos envolvidos em surtos (12,7%). Em estudo realizado por PERESI et al. (2006) com cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo no período de 1990 e 2003, não foram detectadas cepas com resistência à gentamicina, assim como observado por

FERNANDES et al. (2003) em *S. Enteritidis* isoladas de alimentos entre os anos de 1975 e 1995.

Para os demais antibióticos utilizados no presente estudo, os índices de resistência foram baixos. Apenas duas cepas (*S. Typhimurium* e *S. Saintpaul*) apresentaram resistência a ampicilina; duas (*S. Typhimurium*) ao cloranfenicol; uma ao trimetopim-sulfametoxazol (*S. Typhimurium*); três a canamicina (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Hadar*) e cinco cepas (*S. Typhimurium*, *S. Derby* e *S. enterica* I 4, 12: i:-) foram resistentes as sulfonamidas. Merecem destaque os baixos índices observados para as sulfonamidas, uma vez que diversos estudos brasileiros revelam níveis mais elevados de resistência a este antibiótico em *Salmonella* (TAVECHIO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; GHILARDI et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2006; BESSA et al., 2007).

Com relação a multi-resistência, foram observados índices preocupantes no presente estudo. Entre as 237 cepas avaliadas, 25 (10,5%) apresentaram multi-resistência, sendo 5 (11,9%) cepas isoladas de alimentos envolvidos em surtos e 20 (10,2%) de alimentos não associados a surtos. Entre as cepas multi-resistentes, resistência a dois antibióticos foi observada em *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Brandenburg*, *S. Hadar*, *S. I 4,5,12:i:-*, *S. I 4,12:i:-* e *S. I6,8: Z10:-*; a três antibióticos em *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Hadar* e apenas cepas de *S. Typhimurium* apresentaram resistência a quatro drogas antimicrobianas.

Frequências mais elevadas foram observadas no PREBAF em que 76,8% das cepas isoladas de carcaças de frango foram multi-resistentes (mais de dois antibióticos). Ainda, 91,6% das cepas de *S. Enteritidis* apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (ANVISA, 2008).

Com relação às cepas de *S. Enteritidis* avaliadas neste estudo, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre a taxa de multi-resistência apresentada pelas cepas associadas a surtos (11,4%) em relação àquelas não associadas a toxinfecções alimentares (12,5%). Multi-resistência similar em cepas isoladas de alimentos, também, foi observada por outros autores (FERNANDES et al., 2003; OLIVEIRA et al, 2006).

Multi-resistência em *S. Typhimurium* foi constatada em 40% das cepas, entretanto o fenótipo denominado de penta-resistência característico neste sorovar, principalmente no fagotipo DT104, não foi detectado entre as cepas estudadas.

Tabela 14. Freqüência (%) de resistência aos 15 antimicrobianos avaliados de acordo com o ano de isolamento das cepas de *Salmonella* spp.

Antibióticos	Ano																						
	1983	1984	1986	1987	1988	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007
AMP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,4	0	0	0	0	16,7
FOX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CEF	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CTX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CHL	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,7	0	0	0	0	0
TET	0	0	0	33,3	0	10	0	5,3	8,3	0	0	0	6,25	0	0	0	0	20,7	0	0	0	0	0
AK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GEN	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0	0	8,3	15,4	13,8	0	0	0	0	0
STX	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16,7
CIP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NAL	0	0	0	0	0	0	0	0	2,8	0	0	0	0	0	0	25	0	20,7	57,1	74,2	50	33,3	16,7
IPM	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
KAN	0	0	0	0	0	0	0	5,3	0	0	0	0	0	0	0	8,3	7,7	0	0	0	0	0	0
SSS	0	0	0	0	0	0	25	0	2,8	0	0	0	6,25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16,7
STR	0	100	38,5	66,6	0	50	50	57,9	41,7	0	0	20	37,5	33,3	16,7	33,3	23,1	41,4	14,3	12,9	0	66,7	66,7

AMP, ampicilina; FOX, cefoxitina; CEF, cefalotina; CTX, cefotaxima; CHL, cloranfenicol; TET, tetraciclina; AK, amicacina; GEN, gentamicina; STX, trimetoprim-sulfametoxazol; CIP, ciprofloxacina; NAL, ácido nalidixico; IPM, imipenem; KAN, canamicina; SSS, sulfonamidas; STR, estreptomicina.

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana em bactérias zoonóticas, como *Salmonella*, constitui um risco para a saúde pública com diversas conseqüências para a saúde humana. A aquisição de resistência para drogas de importância clínica pode aumentar o risco de falhas no tratamento e limitar a escolha terapêutica (MOLBAK, 2005). A ineficiência de drogas comumente utilizadas no tratamento da salmonelose severa ou sistêmica, como as cefalosporinas e fluoroquinolonas, gera a necessidade do uso de drogas mais tóxicas e onerosas como, por exemplo, o imipenem, utilizado para o tratamento de infecções associadas com cepas resistentes as cefalosporinas de espectro expandido (HOWARD et al., 2003).

A resistência antimicrobiana contribui, ainda, para o aumento de surtos em hospitais e para ocorrência de doenças transmitidas por alimentos. Indivíduos submetidos a antibioticoterapia, por uma condição médica qualquer, estão mais susceptíveis a infecções por patógenos resistentes presentes em alimentos (MOLBAK, 2005).

Uma outra consequência da resistência antimicrobiana está relacionada com o aumento no número de hospitalizações em pacientes acometidos por *Salmonella* resistentes (VARMA et al., 2005). Estima-se que nos EUA a resistência antimicrobiana em *Salmonella* não-tifóides tenha contribuído para a ocorrência de 29.379 infecções extras, anualmente, causando 342 hospitalizações adicionais e 12 mortes (BARZA e TRAVERS, 2004). Há evidências de que bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos estejam associadas com doenças mais graves e com altas taxas de mortalidade (HELMS et al, 2004) devido, provavelmente, a co-seleção de fatores de virulência (integração de plasmídeos contendo genes de resistência e virulência) (FLUIT, 2005).

A crescente globalização da produção e comercialização de produtos alimentícios possibilita a disseminação de microrganismos patogênicos entre diversos países, aumentando o risco de incidentes envolvendo produtos contaminados. Segundo THRELFALL et al. (2006), o aumento do número de infecções associadas com *Salmonella* Enteritidis PT1 resistentes ao ácido nalidíxico, durante o período de 2002 a 2004 no Reino Unido, foi relacionado ao consumo de alimentos preparados com ovos importados da Espanha. Em estudo realizado por SKOV et al. (2007) na Dinamarca, as maiores taxas de resistência e multi-resistência foram observadas em cepas de *Salmonella* isoladas de produtos cárneos importados quando comparados aos produtos nacionais.

Os dados apresentados no presente estudo confirmam a importância do monitoramento da resistência antimicrobiana e da caracterização das cepas quanto à presença de genes de virulência em cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos. A presença de resistência antimicrobiana e genes de virulência tanto nas cepas isoladas de alimentos envolvidos em surtos como naquelas não envolvidas em surtos, demonstram o risco potencial associado ao consumo de alimentos contaminados com *Salmonella*.

6. CONCLUSÕES

- a) Resistência e multi-resistência foram observadas tanto nas cepas associadas à toxinfecções alimentares como naquelas não associadas, demonstrando a importância dos alimentos como fontes de *Salmonella* com estas características.
- b) Os genes de virulência *invA*, *spvC*, *pefA* e *sefA* apresentaram ampla distribuição entre as cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos associados ou não à toxinfecções alimentares, sendo o gene *sefA* observado somente em *Salmonella* Enteritidis.
- c) Os quatro genes de virulência estudados foram observados na maioria das cepas de *Salmonella* Enteritidis, não havendo diferença entre os resultados para as cepas isoladas de alimentos associados e não associados à toxinfecções alimentares.
- d) Diferenças foram observadas entre os índices de resistência apresentados pelas cepas de *Salmonella* Enteritidis associadas e não associadas à toxinfecções alimentares. A maior frequência de carne de frango e derivados entre os alimentos não associados à toxinfecções pode ter contribuído para esta diferença, sendo estes produtos considerados fontes importantes de *S. Enteritidis* resistente aos agentes antimicrobianos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; HASMAN, H.; OLSEN, I.; SORENSEN, G. International spread of bla(CMY-2)-mediated cephalosporin resistance in a multiresistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolate stemming from the importation of a boar by Denmark from Canada. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.5, p.1916-7, 2004.

ALCAINE, S.D.; WARNICK, L.D.; WIEDMANN, M. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. **J. Food Prot.**, v.70, n.3, p.780-90, 2007.

ALMEIDA, I.A.Z.C.; PERESI, J.T.M.; CARVALHO, I.S.; RODRIGUES, E.C.A.; MARQUES, D.F.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990-1999. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.59, n.1/2, p.33-7, 2000.

ALONSO, H.; GREASY, J.E. Integron-sequestered dihydrofolate reductase: a recently redeployed enzyme. **Trends Microbiol.**, v.14, n.5, p.236-42, 2006.

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. **Microb. Drug Resist.**, v.9, n.4, p.373-379, 2003.

ANDERSON, E.S. Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. **BMJ**, v.3, n.5614, p.333-9, 1968.

ANGULO, 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. **Microb. Drug Resist.**, v.6, n.1, p.77-83, 2000.

ANGULO, F.J.; NARGUND, V.N.; CHILLER, T.C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, v.51, n.8/9, p.374-9, 2004.

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. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.58, n.2, p.297-304, 2006.

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. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, n.2, p.836-9, 2005.

ANTUNES, P.; RÉU, C.; SOUSA, J.C.; PEIXE, L.; PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **Int. J. Food Microbiol.**, v.82, n.2, p.97-103, 2003.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isoladas de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil.** Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), Brasília, 2008. 186p.

ARTHUR, T.M.; BOSILEVAC, J.M.; NOU, X.; SHACKELFORD, S.D.; WHEELER, T.L.; KENT, M.P.; JARONI, D.; PAULING, B.; ALLEN, D.M.; KOOHMARAIE, M. *Escherichia coli* O157 prevalence and enumeration of aerobic bacteria, *Enterobacteriaceae*, and *Escherichia coli* O157 at various steps in commercial beef processing plants. **J. Food Prot.**, v.67, n.4, p. 658–65, 2004.

BARZA, M.; TRAVERS, K. Excess infections due to antimicrobial resistance: the "Attributable Fraction". **Clin. Infect. Dis.**, v.34, (suppl 3), S126-30, 2002.

BAU, A.C.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.303-7, 2001.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.45, n.4, p.493-6, 1966.

BÄUMLER, A.J.; GILDE, A.J.; TSOLIS, R.M.; VAN DER VELDEN, A.W.; AHMER, B.M.; HEFFRON, F. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. **J. Bacteriol.**, v.179, n.2, p.317-22, 1997.

BÄUMLER AJ, TSOLIS RM, BOWE FA, KUSTERS JG, HOFFMANN S, HEFFRON F. The pef fimbrial operon of *Salmonella typhimurium* mediates adhesion to murine small intestine and is necessary for fluid accumulation in the infant mouse. **Infect. Immun.**, v.64, n.1, p.61-8, 1996.

BESSA, M.C.; MICHAEL, G.B.; CANU, N.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M.; RABSCH, W.; RUBINO, S. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. **Res. Vet. Sci.**, v.83, n.3, p.302-10, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003** Brasília, 2003. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1398>. Acesso em: 15 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 11, de 24 de novembro de 2004**. Brasília, 2004. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=10151>. Acesso em: 15 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Portaria nº 29, de 29 de janeiro de 2007**. Brasília, 2007. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=17601>. Acesso em: 15 out. 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento **Portaria Ministerial nº 193, de 12 de maio de 1998**. Brasília, 1998. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1125>. Acesso em: 15 out 2007.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, n.6, p.1211–33, 1995.

BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.22, n.3, p.205-10, 2003.

CABRERA, R.; RUIZ, J.; MARCO, F.; OLIVEIRA, I.; ARROYO, M.; ALADUEÑA, A.; USERA, M.A.; JIMÉNEZ DE ANTA, M.T.; GASCÓN, J.; VILA, J. Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in *Salmonella* clinical isolates causing traveler's diarrhea. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.10, p.3934–9, 2004.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Vet. Res.**, v.32, n.3/4, p.243-59, 2001.

CARATTOLI, A. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v.5, n.4, p.113-22, 2003.

CARDOSO, M.O.; RIBEIRO, A.R.; SANTOS, L.R.; PILOTTO, F.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P; ROCHA, S.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. **Braz. J. Microbiol.**, v.37, n.3, p.368-71, 2006.

CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Vet. Microbiol.**, v.104, n.1/2, p.133-9, 2004.

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

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

CASTILLA, K.S.; FERREIRA, C.S.A.; MORENO, A.M.; NUNES, I.A.; FERREIRA, A.J.P. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v.37, n.2, p.135-39, 2006.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. 2004. **National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria (NARMS). Human Isolates Final Report.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/narms/NARMSAnnualReport2004.pdf>. Acesso em: 05 out. 2007.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — 10 States, United States, 2005. **MMWR**, v.55, n.14, p. 392-395, 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5514a2.htm>. Acesso em: 05 out. 2007.

CHIAPPINI, E.; GALLI, L.; PECILE, P.; VIERUCCI, A.; DE MARTINO, M. Results of a 5-year prospective surveillance study of antibiotic resistance among *Salmonella enterica* isolates and ceftriaxone therapy among children hospitalized for acute diarrhea. **Clin Ther.**, v.24, n.10, p.1585–94, 2002.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 65, n. 2, p. 232-60, 2001.

CIPARS. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance. **Final Report, 2005**. Disponível em: http://www.phac-aspc.gc.ca/cipars-picra/2005_e.html Acesso em: 07 abril 2008.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada - Sexta Edição. **CLSI documento M7-A6**, v.23, n.2, p.1-53, 2005a.

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acesso em: 20 jan. 2008.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos: 15° suplemento informativo. **CLSI documento M100-S15**, v.25, n.1, p.2-177, 2005b. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acesso em: 18 out. 2007.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - Oitava Edição. **CLSI documento M2-A8**, v.23, n.1, p.2-58, 2005c. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi.asp>. Acesso em: 18 out. 2007.

COBURN, B.; LI, Y.; OWEN, D.; VALLANCE, B.A.; FINLAY, B.B. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. **Infect. Immun.**, v.73, n.6, p.3219-27, 2005.

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

COLLIGHAN, R.J.; WOODWARD, M.J. The SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is encoded within a pathogenicity islet. **Vet. Microbiol.**, v.80, n.3, p.235-45, 2001.

CORTEZ, A.L.; CARVALHO, A.C.; IKUNO, A.A.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Res. Vet. Sci.**, v.81, n.3, p.340-4, 2006.

COX, L.A.Jr.; RICCI, P.F. Causal regulations vs. political will: Why human zoonotic infections increase despite precautionary bans on animal antibiotics. **Environ Int.**, 2008. Article in Press.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – CVE/SES/SP. Centro de Vigilância Epidemiológica. INFORM-NET. **Documento técnico: Doenças Transmitidas por Água e Alimentos - Análise de Séries Históricas**, 2006.

Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_doctec.htm. Acesso em: 05 out. 2007.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, MP, BEUCHAT, LR, eds. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. 3ed. Washington: ASM Press, 2007, cap.10, p.187-236

DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. **J. Appl. Microbiol.**, v.97, n.2, p.233–45, 2004.

DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; MEULEMANS, G.; HAESBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Adhesion of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates to chicken isthmal glandular secretions. **Vet. Microbiol.**, v.93, n.3, p.223-33, 2003.

DE CASTRO, F.A.JR.; DOS SANTOS, V.R.; MARTINS, C.H.; FERNANDES, S.A.; ZAIA, J.E.; MARTINEZ, R. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.6, n.5, p. 244-51, 2002.

DIBB-FULLER, M.P.; ALLEN-VERCOE, E.; THORNS, C.J.; WOODWARD, M.J. Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella enteritidis*. **Microbiology**, v.145, n.5, p.1023-31, 1999.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poult. Sci.**, v.84, n.4, p. 634-43, 2005.

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

DORAN, J.L.; COLLINSON, S.K.; CLOUTHIER, S.C.; CEBULA, T.A.; KOCH, W.H.; BURIAN, J.; BANSER, P.A.; TODD, E.C.; KAY, W.W. Diagnostic potential of *sefA* DNA probes to *Salmonella enteritidis* and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. **Mol. Cell. Probes**, v.10, n.4, p.233-46, 1996.

DOYLE, M.P.; ERICKSON, M.C. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. **Poult. Sci.**, v.85, n.6, p. 960-73, 2006.

DUNNE, E.F.; FEY, P.D.; KLUDT, P.; REPORTER, R.; MOSTASHARI, F.; SHILLAM, P.; WICKLUND, J.; MILLER, C.; HOLLAND, B.; STAMEY, K.; BARRETT, T.J.; RASHEED, J.K.; TENOVER, F.C.; RIBOT, E.M.; ANGULO, F.J. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC beta-lactamase. **JAMA**, v.284, n.24, p.3151-6, 2000.

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

EDWARDS, R.A.; OLSEN, G.J.; MALOY, S.R. Comparative genomics of closely related salmonellae. **Trends Microbiol.**, v.10, n.2, p.94-9, 2002.

EDWARDS, R.A., SCHIFFERLI, D.M.; MALOY, S.R. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.97, n.3, p.1258-62, 2000.

EFSA. European Food Safety Authority (2006). **Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2004**. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Report/zoonoses2004-levels1-2-part11,6.pdf>. Acesso em: 05 out. 2007.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2005a). **Final decision of the commission. Docket n° 2000N-1571. Withdrawal of approval of the new animal drug application for enrofloxacin in poultry.** Disponível em: <http://www.fda.gov/oc/antimicrobial/baytril.html>. Acesso em: 15 abril 2008.

FDA. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (2005b). **Judicious use of antimicrobials for swine veterinarians.** Disponível em: www.fda.gov/cvm/Documents/JUSWINE.pdf
Acesso em: 05 nov. 2007.

FERNANDES, S.A.; GHILARDI, A.C.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 45, n.2, p.59-63, 2003.

FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; DIAS, A.M.; ALMEIDA, I.A.; MELO, L.C. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.48, n.4, p.179-84, 2006.

FEY, P.D.; SAFRANEK, T.J.; RUPP, M.E.; DUNNE, E.F.; RIBOT, E.; IWEN, P.C.; BRADFORD, P.A.; ANGULO, F.J.; HINRICHS, S.H. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. **N. Engl. J. Med.**, v.342, n.17, p.1242-9, 2000.

FLUIT, A.C. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.43, n.1, p.1-11, 2005.

FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super-integrons. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, n.4, p.272-88, 2004.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. **J. Anim. Sci.**, v.86 (suppl.14), E149-62, 2008.

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

FORSHELL, L.P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Rev. - Off. Int. Epizoot.**, v.25, n.2, p.541-54, 2006.

FORSYTHE, S.J. Microrganismos causadores de doenças de origem alimentar. In: **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002, p.162-64.

FRANCHIN, P.R.; AIDOO, K.E.; BATISTA, C.R.V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Braz. J. Microbiol.**, v.36, n.2, p.157-62, 2005.

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, S.A.; FRANCO, B.D. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **J. Food Prot.**, v.63, n.12, p.1749-53, 2000.

GALÁN, J.E.; CURTISS, R.3rd. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella* Typhimurium to penetrate tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.86, n.16, p.6383-7, 1989.

GALÁN, J.E.; CURTISS, R.3rd. Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells. **Infect. Immun.**, v.59, n.9, p.2901-8, 1991.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S.; MORROW, W.E. *Campylobacter coli*: prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.56, n.4, p.765-8, 2005.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; OLIVEIRA, F.A.de; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **J. Food Prot.**, v.67, n.6, p.1229-33, 2004.

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

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. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.43, n.9, p.2131-7, 1999.

GUERRA, B.; SOTO, S.; HELMUTH, R.; MENDOZA, M.C. Characterization of a self-transferable plasmid from *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clinical isolates carrying two integron-borne gene cassettes together with virulence and drug resistance genes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, n.9, p.2977-81, 2002.

GULIG, P.A.; DOYLE, T.J.; HUGHES, J.A.; MATSUI, H. Analysis of host cells associated with the Spv-mediated increased intracellular growth rate of *Salmonella typhimurium* in mice. **Infect. Immun.**, v.66, n.6, p.2471-85, 1998.

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

HAIMOVICH, B.; VENKATESAN, M.M. *Shigella* and *Salmonella*: death as a means of survival. **Microbes Infect.**, v.8, n.2, p. 568-77, 2006.

HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; HELENIUS, H.; SIITONEN, A. Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia. **Emerging Infect. Dis.**, v.7, n.6, p.996-1003, 2001.

HALL, R.M.; COLLIS, C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site specific recombination. **Mol. Microbiol.**, v.15, n.4, p.593-600, 1995.

HANEDA, T.; OKADA, N.; NAKAZAWA, N.; KAWAKAMI, T.; DANBARA, H. Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. **Infect. Immun.**, v.69, n.4, p.2612-20, 2001.

HELMS, M.; SIMONSEN, J.; MOLBAK, K. Quinolone resistance is associated with increased risk of invasive illness or death during infection with *Salmonella* serotype Typhimurium. **J. Infect. Dis.**, v.190, n.9, p.1652-4, 2004.

HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. São Paulo: Varela, 1999. 376 p.

HOWARD, D.H.; SCOTT, R.D.^{2nd}; PACKARD, R.; JONES, D. The global impact of drug resistance. **Clin. Infect. Dis.**, v. 36 (Suppl 1), S4-10, 2003.

IKUNO, A.A.; KANASHIRO, A.M.I.; FRANÇA, S.B.; ALONSO, A.C.; BERNARDI, F.; FERREIRA, V.C.A. Análise da presença de determinantes de virulência *spvC*, *invA*, *sefA* e *pefA* em amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de aves de interesse comercial. In: 25^a Reunião de Genética de Microrganismos, São Pedro, SP, 2006.

JACOBY, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clin. Infect. Dis.**, v.41, p.20-6, 2005.

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

JAY, M.J. Gastrenterites de origem alimentar causadas por *Salmonella* e *Shigella*. In: **Microbiologia de Alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, p.543-57, 2005.

KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M. Serovars of *Salmonella* spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v.7, n.3, p.195-8, 2005.

KIAMA, S.G.; DREHER, D.; COCHAND, L.; KOK, M.; OBREGON, C.; NICOD, L.; GEHR, P. Host cell responses of *Salmonella* Typhimurium infected human dendritic cells. **Immunol. Cell Biol.**, v. 84, n.5 , p.475–81, 2006.

KISS, T.; MORGAN, E.; NAGY, G. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella* enterica. **FEMS Microbiol. Lett.**, v.275, n.1, p.153–9, 2007.

Le MINOR, L. *Salmonella*. In: KRIEG, N.R.; HOLT, J.G., eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. 8 ed. Baltimore/London: Williams & Wilkins, 1984, v.1, p.427-458.

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

LI, X.Z.; NIKAIDO, H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. **Drugs**, v.64, n.2, p.159–204, 2004.

LIBBY, S.J.; ADAMS, L.G.; FICHT, T.A.; ALLEN, C.; WHITFORD, H.A.; BUCHMEIER, N.A.; BOSSIE, S.; GUINEY, D.G. The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. **Infect. Immun.**, v.65, n.5, p.1786-92, 1997.

LITTLE, C.L.; RICHARDSON, J.F.; OWEN, R.J.; DE PINNA, E.; THRELFALL, E.J. *Campylobacter* and *Salmonella* in raw red meats in the United Kingdom: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003-2005. **Food Microbiol.**, v. 25, n.3, p.538-43, 2008.

LOPES, V.C.; VELAYUDHAN, B.T.; HALVORSON, D.A.; NAGARAJA, K.V. Preliminary evaluation of the use of the *sefA* fimbrial gene to elicit immune response against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in chickens. **Avian Dis.**, v.50, n.2, p.185–90, 2006.

LOSTROH, C.P.; LEE, C.A. The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. **Microbes Infect.**, v.3, n.14-15, p.1281-91, 2001.

LUIZ, A.F.; MOREIRA, F.C.; CORREA, E.F.; FALCÃO, D.P. Monitoring of the dissemination of *Salmonella* in the chicken frankfurt-sausage production line of a sausage factory in the state of São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, n.5, p.477-80, 2004.

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

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

MATSUI, H.; BACOT, C.M.; GARLINGTON, W.A.; DOYLE, T.J.; ROBERTS, S.; GULIG, P.A. Plasmid-Borne *spvB* and *spvC* genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. **J. Bacteriol.**, v.183, n.15, p.4652-58, 2001.

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 Infect. Dis.**, v.5, n.5, p.607-25, 1999.

MEAKINS, S.; FISHER, I.S.; BERGHOLD, C.; GERNER-SMIDT, P.; TSCHÄPE, H.; CORMICAN, M.; LUZZI, I.; SCHNEIDER, F.; WANNETT, W.; COIA, J.; ECHEITA, A.; THRELFALL, E.J. Antimicrobial Drug Resistance in Human Nontyphoidal *Salmonella* Isolates in Europe 2000-2004: A Report from the Enter-net International Surveillance Network. **Microb. Drug Resist.**, v.14, n.1, p.31-5, 2008.

MICHAEL, G.B.; BUTAYE, P.; CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes Infect.**, v.8, n.7, p.1898-914, 2006a.

MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.; RABSCH, W.; SCHWARZ, S. Phenotypic and genotypic differentiation of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Derby isolates. **Vet. Microbiol.**, v.118, n.3/4, p. 312–18, 2006b.

MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Agona isolated from pig carcasses in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.55, n.5, p.776–9, 2005.

MIRIAGOU, V.; CARATTOLI, A.; FANNING, S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. **Microbes Infect.**, v.8, n.7, p.1923-30, 2006.

MOLBAK, K. Human health consequences of antimicrobial drug-resistant *Salmonella* and other foodborne pathogens. **Clin. Infect. Dis.**, v.41, n.11, p.1613-20, 2005.

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. **N. Engl. J. Med.**, v.341, n.19, p.1420-5, 1999.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.47-51, 2004.

NAUGHTON, P.J.; GRANT, G.; SOJKA, M.; BARDOCZ, S.; THORNS, C.J.; PUSZTAI, A. Survival and distribution of cell-free SEF 21 of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in the stomach and various compartments of the rat gastrointestinal tract in vivo. **J. Med. Microbiol.**, v.50, n.12, p.1049-54, 2001.

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

NDE, C.W. ; LOGUE, C.M. Characterization of antimicrobial susceptibility and virulence genes of *Salmonella* serovars collected at a commercial turkey processing plant. **J. Appl. Microbiol.**, v.104, n.1, p.215-23, 2008.

O'BRIEN, T.F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clin. Infect. Dis.**, v.34 (suppl. 3), S78-84, p.78-84, 2002.

OCHMAN, H.; GROISMAN, E.A. Distribution of pathogenicity islands in *Salmonella* spp. **Infect. Immun.**, v.64, n.12, p.5410-2, 1996.

OLAH, P.A.; SHERWOOD, J.S.; LOGUE, C.M. Molecular analysis of *Salmonella* isolates recovered from processed turkey carcasses. **J. Food Prot.**, v.68, n.4, p.845-9, 2005.

OLIVEIRA, F.A.; BRANDELLI, A.; TONDO, E.C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **New Microbiol.**, v.29, n.1, p.49-54, 2006.

OLIVEIRA, S.D.; RODENBUSCH, C.R.; MICHAEL, G.B.; CARDOSO, M.R.I.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. **Braz. J. Microbiol.**, v.34, n.1, p.123-24, 2003.

OLIVEIRA, S.D.; SIQUEIRA FLORES, F.; DOS SANTOS, L.R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **Int. J. Food Microbiol.**, v.97, n.3, p.297–305, 2005.

OLSEN, S.J.; BISHOP, R.; BRENNER, F.W.; ROELS, T.H.; BEAN, N.; TAUXE, R.V.; SLUTSKER, L.. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotype isolated from humans in the United States, 1987-1997. **J. Infect. Dis.**, v.183, n.5, p.753–61, 2001.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K.L.; BENTLEY, S.D.; HOLDEN, M.T.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R.M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T.T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T.S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; O'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARRELL, B.G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. **Nature**, v.413, n.6858, p.848-52, 2001.

PEIRANO, G.; AGERSO, Y.; AARESTRUP, F.M.; REIS, E.M.; RODRIGUES, D.P. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.58, n.2, p.305-9, 2006.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; CARDIGA, E.A.; MARQUES, D.F.; CARNICEL, F.A.; HOFFMANN, F.L. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v.65, n.2, p.112-7, 2006.

POOLE K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, n.2, p.479-87, 2005.

POOLE, K. Resistance to β -lactam antibiotics. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.61, n.17, p.2200–23, 2004

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (n^o. 46) to the Kauffmann–White scheme. **Res. Microbiol.**, v.155, n.7, p.568–570, 2004.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A.; DOS SANTOS, L.R.; FITTÉL, A.P.; DO NASCIMENTO, V.P. Resistência antimicrobiana em *salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arq. Inst. Biol.**, v.73, n.3, p.357-60, 2006.

RISTORI, C.A.; BERGAMINI, A.M.M.; DE PAULA, A.M.R.; ROWLANDS, R.E.G.; LOPES, G.I. S.L.; DE OLIVEIRA, M.A.; RIBEIRO, E.G.A.; TORRE, J.C.M.D; PRADO, S.P.T.; YOSHIDA, J.T.U.; RODRIGUES, R.S.M.; TAHA, O.G.; MARSIGLIA, D.A.P.; JAKABI, M. Prevalência de *Salmonella* sp., *Enterococcus* sp. e avaliação dos dizeres de rotulagem de carcaças de frango congeladas, comercializadas no Estado de São Paulo. In: XV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos – Congresso Latino Americano de Analistas de Alimentos. CE, 2007. **Anais**.CD-ROM. Res. MIB-73

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

ROTGER, R.; CASADESÚS, J. The virulence plasmids of *Salmonella*. **Int. Microbiol.**, v.2, n.3, p.177-84, 1999.

RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. **Vet. Microbiol.**, v.112, n.1, p.1-10, 2006.

SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesqui. Vet. Bras.**, v.20, n.1, p.39-42, 2000.

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

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

SEFTON, A.M. Mechanisms of antimicrobial resistance their clinical relevance in the new millennium. **Drugs**, v.62, n.4, p.557-66, 2002.

SEO, K.H.; VALENTIN-BON, I.E.; BRACKETT, R.E.; HOLT, P.S. Rapid, specific detection of *Salmonella* Enteritidis in pooled eggs by Real-Time PCR. **J. Food Prot.**, v.67, n.5, p.864–69, 2004.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U(VI) - reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.70, n.5, p.2959–65, 2004.

SHEPPARD, M.; WEBB, C.; HEATH, F.; MALLOWS, V.; EMILIANUS, R.; MASKELL, D.; MASTROENI, P. Dynamics of bacterial growth and distribution within the liver during *Salmonella* infection. **Cell. Microbiol.**, v.5, n.9, p. 593-600, 2003.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, 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 Dis.**, v.50, n.1, p. 77-81, 2006.

SKOV, M.N.; ANDERSEN, J.S.; AABO, S.; ETHELBERG, S.; AARESTRUP, F.M.; SORENSEN, A.H.; SORENSEN, G.; PEDERSEN, K.; NORDENTOFT, S.; OLSEN, K.E.; GERNER-SMIDT, P.; BAGGESEN, D.L. Antimicrobial drug resistance of *Salmonella* isolates from meat and humans, Denmark. **Emerging Infect. Dis.**, v.13, n.4, p.638-41, 2007.

SMITH, C.A.; BAKER, E.N. Aminoglycoside antibiotic resistance by enzymatic deactivation. **Curr. Drug Targets Infect. Disord.**, v.2, n.2, p.143-60, 2002.

SOTO, S.M.; RODRÍGUEZ, I.; RODICIO, M.R.; VILA, J.; MENDOZA, M.C. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. **J. Med. Microbiol.**, v.55, n.14, p. 365-73, 2006.

STONE, G.G.; OBERST, R.D.; HAYS, M.P.; McVEY, S.; GALLAND, J.; CURTSS, R.; KELLY, S.M.; CHEMGAPPA, M. Detection of *S. typhimurium* from rectal swabs of experimentally infected beagles by short cultivation and PCR hybridization. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.5, p.1292-95, 1994.

SU, L.H.; CHIU, C.H.; CHU, C.; OU, J.T. Antimicrobial resistance in nontyphoid *Salmonella* serotypes: a global challenge. **Clin. Infect. Dis.**, v.39, n.4, p.546-51, 2001.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico** ano 05 n° 06 p. 2-7, 2005.

Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_6_2005_corrigido.pdf . Acesso em: 04 jun. 2007.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999-2007** (2007). Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=27527. Acesso em: 05 maio 2008.

SWAMY, S.C.; BARNHART, H.M.; LEE, M.D.; DREESEN, D.W. Virulence determinants *invA* and *spvC* in salmonellae isolated from poultry products, wastewater, and human sources. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.62, n.10, p.3768-71, 1996.

SWARTZ, M.N. Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin. **Clin. Infect. Dis.**, v.34, p.111-22, 2002.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.38, n.5, p.315-22, 1996.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; FERNANDES, S.A. "Multiplex PCR" identification of the atypical and monophasic *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:- in São Paulo state, Brazil: frequency and antibiotic resistance patterns. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v.46, n.2, p.115-7, 2004.

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

TEIXEIRA, D.M.F. ***Salmonella* spp. em frangos de corte criados com e sem o emprego de promotores de crescimento: prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos das cepas isoladas.** Botucatu, 2006. 57p. Dissertação de Mestrado - Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia - Universidade Estadual Paulista.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am. J. Med.**, v.119, p.3-10, 2006.

THAKUR, S.; TADESSE, D.A.; MORROW, M.; GEBREYES, W.A. Occurrence of multidrug resistant *Salmonella* in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. **Vet. Microbiol.**, v.125, n.3/4, p.362-7, 2007.

THRELFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.26, n.2, p.141-8, 2002.

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

THIAGARAJAN, D.; SAEED, M.; TUREK, J.; ASEM, E. In vitro attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella enteritidis* phage type 8. **Infect. Immun.**, v.64, n.12, p.5015-21, 1996.

TIROLI, I.C.C.; COSTA, C.A. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Amazônica**, v.36, n.2, p.205-8, 2006.

VALDEZATE, S.; ARROYO, M.; GONZÁLEZ-SANZ, R.; RAMÍRO, R.; HERRERA-LEÓN, S.; USERA, M.A.; DE LA FUENTE, M.; ECHEITA, A. Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food for human consumption in Spain. **J. Food Prot.**, v.70, n.12, p.2741-8, 2007.

VAN ASTEN, A.J.; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v.44, n.3, p.251-9, 2005.

VARMA, J.K.; GREENE, K.D.; OVITT, J.; BARETT, T.J.; MEDALLA, F.; ANGULO, F.J. Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984–2002. **Emerging Infect. Dis.**, v.11, n.6, p.943–6, 2005.

VARNAM, A.H.; EVANS, M.G. *Salmonella*. In: **Foodborne Pathogens**. St. Louis: Mosby Year Book; London: Wolfe, p. 51-85, 1991.

VAZ, C.S.L. **Determinação da diversidade fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2007. 136p. Tese de Doutorado – Faculdade de Veterinária - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

VESSONI, C.L.Z. **Resistência a antimicrobianos em cepas de *Salmonella* spp, *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp isoladas de carcaças de frango**. Campinas, 2004. 100p. Dissertação de Mestrado – Departamento de Ciências de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas.

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

WHITE, D.G.; HUDSON, C.; MAURER, J.J.; AYERS, S.; ZHAO, S.; LEE, M.D.; BOLTON, L.; FOLEY, T.; SHERWOOD, J. Characterization of chloramphenicol and florfenicol resistance in *Escherichia coli* associated with bovine diarrhea. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.12, p.4593–8, 2000.

WHO. World Health Organization (2007). **Food safety and foodborne illness. Fact sheet N°237**.

Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/print.html>. Acesso em 05 out. 2007.

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

WOODWARD, M.J.; KIRWAN, S.E. Detection of *Salmonella enteritidis* in eggs by the polymerase chain reaction. **Vet. Rec.**, v.138, n.17, p.411-3, 1996.

ZHANG, S.; SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; STENDER, S.; HARDT, W.; BÄUMLER, A.J.; ADAMS, L.G. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium effector proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. **Infect. Immun.**, v.70, n.7, p.3843–55, 2002.

ZHAO, S.; McDERMOTT, P.F.; FRIEDMAN, S.; QAIYUMI, S.; ABBOTT, J.; KIESSLING, C.; AYERS, S.; SINGH, R.; HUBERT, S.; SOFOS, J.; WHITE, D.G. Characterization of antimicrobial-resistant *Salmonella* isolated from imported foods. **J. Food Prot.**, v.69, n.3, p.500-7, 2006.

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. **J. Clin. Microbiol.**, v.41, n.12, p.5366-71, 2003.