

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
E DO AMBIENTE

**SOBREVIVÊNCIA EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO E CAPACIDADE DE
INVASÃO INTESTINAL DE *Salmonella* Enteritidis E *Salmonella* Typhimurium
INDUZIDAS E NÃO INDUZIDAS À ADAPTAÇÃO ÁCIDA**

Karla Joseane Perez

Porto Alegre, RS, Brasil
Março 2008

**SOBREVIVÊNCIA EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO E CAPACIDADE DE
INVASÃO INTESTINAL DE *Salmonella* Enteritidis E *Salmonella* Typhimurium
INDUZIDAS E NÃO INDUZIDAS À ADAPTAÇÃO ÁCIDA**

Karla Joseane Perez

Bióloga

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Área de concentração: Microbiologia de Alimentos.

Orientador: Eduardo César Tondo
Co-Orientador: Erna Vogt Jong

Porto Alegre, RS, Brasil
Março 2008

Dedico este trabalho:

À minha mãe Orlanda
minha maior mestre hoje e sempre.

Ao meu noivo Robson
pelo seu amor, carinho e incentivo incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Eduardo C. Tondo pela orientação, paciência, apoio e perseverança durante todo o transcorrer deste trabalho, especialmente pelo exemplo profissional que representa.

À profa. Dra. Erna V. Jong, pela co-orientação presente, carinho, amizade, auxílio na experimentação animal e em diversas etapas deste trabalho, sempre me recebendo e me orientando em qualquer hora que eu precisava.

Aos professores do PPGMAA em especial às professoras Dra. Gertrudes Corção, Dra. Marisa Cardoso, Dra. Isa B Noll, Dra. Patrícia Valente, Dra. Ana Paula Frazzon, Dra. Sueli T. Vand Der Sand e Dra. Marisa da Costa e professores Dr. José C. Germani e Dr. Amauri Simonetti pelas sugestões, pela convivência e por todos os conhecimentos transmitidos.

À profa. Dra. Mercedes P. Geimba do Laboratório de Microbiologia da PUC/RS e à profa. Dra. Marisa Cardoso da Faculdade de Veterinária da UFRGS por cederem as cepas utilizadas neste trabalho.

Ao prof. Dr. Jacques R. Nicoli do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos do Departamento de Ciências Biológicas da UFMG por me receber em seu laboratório em duas oportunidades como se eu fosse sua orientada, pela sua simplicidade e colaboração na execução da parte deste trabalho com animais "germ-free" e principalmente pelo exemplo de pesquisador.

À bolsista Raquel V. Ceccon por todo o auxílio, persistência e dedicação na realização da parte prática deste trabalho.

À Msc. Janaína Venzke pela disposição, colaboração, amizade e carinho sempre que necessários na experimentação animal realizada neste trabalho.

Ao Msc. Cabral Pavei do Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) da Faculdade de Farmácia da UFRGS pela utilização de equipamento em seu laboratório.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela convivência, auxílio e amizade, em especial à Patricia S. Malheiros e à Cheila M. D. de Paula pelas sugestões e auxílio na realização deste trabalho.

À todos os colegas de mestrado pela companhia, amizade e troca de experiências. Especialmente à Cátia T. dos Passos, à Vanessa Pavan, à Vanessa D. Mottin, à Kelly F. Priotto e à Maira Peres.

Aos professores, funcionários e alunos do ICTA/UFRGS pelo ambiente de trabalho, convivência e sugestões, especialmente aos professores Dr. Jeverson Frazzon, Dr. Plinho Heatz e Dr. Adriano Brandelli. Também ao funcionário Jorge pelo auxílio na lavagem e esterilização de materiais.

Aos ex-professores, ex-orientadores e agora amigos Msc. Fernanda B. da Cunha e Msc. Cassius U. Sardiglia por me apresentarem à microbiologia, pelo incentivo e apoio sempre.

Aos amigos de longe que tanto me incentivaram, em especial à Eliandra M. Rossi, que apesar da distância e da minha ausência, sempre esteve presente. À ela meu agradecimento pela amizade, companheirismo e exemplo de profissional, colega e amiga.

À Andressa Bonavigo, Clarissa G. Vido e Juliana Crestani pela amizade e companheirismo e por terem se tornado quase minha família durante todo este período.

A todos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos da UFMG por terem me recebido tão bem, auxiliando-me nos experimentos e pela amizade conquistada. Em especial ao Dr. Flaviano Martins e à Msc. Ariane Martins pelo grande auxílio e apoio na experimentação com animais “germ-free”.

Agradeço também à Denise C. C. Machado do Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG por ter realizado as análises de patologia e histologia dos animais “germ-free”.

Finalmente aos meus familiares, por me incentivarem sempre a prosseguir e dar um passo mais adiante.

Às minhas queridas irmãs Karine e Karen, pelo apoio, amizade, incentivo e cumplicidade em todos os momentos, mesmo estando longe.

À minha mãe, Orlanda, minha grande mestre ao me ensinar a ter persistência, buscar o conhecimento e me apoiar incondicionalmente, durante este período, apesar da distância, não importando a decisão que eu tomasse.

Ao Robson, meu noivo e meu amor, por todo seu carinho, compreensão e amor. Por estar presente, mesmo quando não era possível estar, por acreditar em mim e estar comigo nos bons e maus momentos, até mesmo nos dias de incansáveis experimentos em feriados e fins de semana. A ele meu reconhecimento e meu amor por tudo, especialmente pelo exemplo de ser humano que é para mim.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro.

E, enfim, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para que este trabalho fosse possível e que não foram aqui citados, os meus mais sinceros agradecimentos e em especial o meu agradecimento a Deus, sem o qual nada disso teria sido possível.

"Vocês jovens doutores e cientistas do futuro,
não se deixem macular por um ceticismo estéril
e nem sejam desencorajados pela tristeza
que as nações passam em certas horas.
Não fiquem bravos com seus adversários.
Nenhuma teoria científica já foi aceita sem oposição.
Vivam na paz de suas bibliotecas e laboratórios.
Perguntem-se antes: "O que fiz pela minha instrução?"
E ao avançarem gradualmente: "O que estou conseguindo?"
Até que chegue a hora que terão a imensa felicidade
de pensar que contribuíram de algum modo
para o bem-estar e progresso da humanidade."

(Louis Pasteur, 1936)

RESUMO

Sobrevivência em fluido gástrico simulado e capacidade de invasão intestinal de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium induzidas e não induzidas à adaptação ácida

Autor: Karla Joseane Perez

Orientador: Eduardo César Tondo

Co-orientadora: Erna Vogt Jong

No Rio Grande do Sul, um grupo clonal de *Salmonella* Enteritidis vem sendo identificada como o principal microrganismo causador de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) nos últimos anos. Em vista disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sobrevivência em fluido gástrico simulado (FGS) e a capacidade de invasão intestinal de *Salmonella* Enteritidis (SE86) em comparação à *Salmonella* Typhimurium (ST99) em dois modelos animais. Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura e meio de cultura suplementado com glicose, objetivando a adaptação ácida. Aproximadamente 9logUFC dos microrganismos SE86 e ST99, ácido-adaptados ou não adaptados, foram expostos ao FGS, com pH 1,5, e também inoculados por via oral em ratos Wistar adultos machos. Um inóculo de 2logUFC foi utilizado nos experimentos com camundongos “germ-free”, de 21 dias, mantidos em condições assépticas. As fezes e porções do trato gastrointestinal foram analisadas microbiologicamente, sendo que os ratos foram também investigados quanto a lesões morfológicas intestinais. Os camundongos foram analisados por histopatologia e submetidos à curva de mortalidade. Os resultados indicaram que SE86 ácido-adaptadas apresentaram uma sobrevivência significativamente maior ($p < 0,05$) que às SE86 e ST99 não adaptadas ao ácido e também às ST99 ácido-adaptadas no FGS. Os experimentos “in vivo” demonstraram que as bactérias inoculadas foram capazes de provocar lesões morfológicas intestinais e foram recuperadas das fezes, do jejuno e da junção íleo-cecal dos ratos, sendo que contagens mais altas de SE86 e ST99 ácido-adaptadas foram encontradas nas fezes. SE86 ácido-adaptada demonstrou maior contagem no íleo-ceco do que as outras linhagens, sugerindo que a adaptação ácida influenciou na virulência deste microrganismo. Nos animais “germ-free” houve rápida multiplicação de todos os microrganismos inoculados, contudo a mortalidade ocorreu de forma mais rápida devido à infecção por SE86 ácido-adaptada. A análise histopatológica revelou maior severidade da infecção provocada pela SE86, o que foi confirmado pela mortalidade dos animais a partir do quarto dia de infecção, ao contrário da ST99 que não provocou a morte dos animais por até 12 dias. A maior sobrevivência e virulência apresentadas pela SE86 podem estar relacionadas com o freqüente envolvimento desta cepa com salmoneloses alimentares na última década no Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: *Salmonella*, Fluido Gástrico Simulado, sobrevivência, ratos, camundongos.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (100 p.). Março, 2008.

ABSTRACT

Survival in simulated gastric fluid and ability to intestinal invasion of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium induced and not induced to adapt acid

Author: Karla Joseane Perez

Adviser: Eduardo César Tondo

Co-Adviser: Erna Vogt Jong

In Rio Grande do Sul (RS) State, Southern Brazil, a clonal group of *Salmonella* Enteritidis has been identified as the main cause of foodborne diseases, in the last years. Given that, the objective of this study was to evaluate the survival in simulated gastric fluid (FGS) and the intestinal invasion ability of *Salmonella* Enteritidis (SE86) and *Salmonella* Typhimurium (ST99) submitted or not to acid adaptation. The microorganisms were grown in culture media and culture media supplemented with glucose, aiming to promote acid adaptation. After that, approximately 9log of SE86 (Isolated from a foodborne outbreak) and ST99 (not involved with foodborne outbreaks), acid-adapted or not adapted, were exposed to FGS with pH 1.5, and inoculated in adult male Wistar rats. Germ-free mice were also inoculated but with approximately 2 log, and the animals were observed during 21 days, at aseptic conditions. Animal feces and portions of the gastrointestinal tract were examined by microbiological analysis, and the rats were also investigated for intestinal morphological damage. The mice were analyzed by histopathology and submitted to the mortality curve. The results indicated that acid-adapted SE86 had a significant higher survival rate ($p < 0.05$) than not adapted SE86, not adapted ST99, and also than acid-adapted ST99, in the FGS. The "in vivo" experiments demonstrated that the strains were capable of causing intestinal morphological damage and were recovered from feces, jejunum and ileum-cecal junction of rats, with higher counts being demonstrated for acid-adapted SE86 and acid-adapted ST99. Acid-adapted SE86 showed higher counts in the ileum-cecal junction than the other strains, suggesting that acid adaptation influenced the virulence of this microorganism. After inoculation, all strains were able to rapidly multiply in germ-free animals, but mortality caused by acid-adapted SE86 was more intense. Histopathological analyses revealed greater infection's severity caused by SE86, and it was confirmed by the death of animals starting at the fourth day of infection, unlike the ST99 which did not cause the death of animals until twelve days of inoculation. Based on these results, the higher survival rates in FGS and the higher virulence presented by the SE86 can be related to the frequent involvement of this strain with foodborne salmonellosis occurred in the last decade in RS.

Key-words: *Salmonella*, Gastric Simulated Fluid, survival, rats, mouse.

¹Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (100 p.). March, 2008.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Redução Logaritimica de *Salmonella* Enteritidis (Δ SE86) e *Salmonella* Typhimurium (\blacksquare ST99) não ácido adaptadas durante a exposição em Fluido Gástrico Simulado (FGS), com pH 1,5. Cada ponto foi representado pelo desvio padrão da média (n=4).....55
- Figura 2: Redução Logaritimica de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium ácido adaptadas durante a exposição em Fluido Gástrico Simulado (FGS) com pH 1,5. Cada ponto foi representado pelo desvio padrão da média (n=4).....56
- Figura 3. Sobrevivência de camundongos “germ-free” NHI Swiss nos dois grupos que apresentaram mortalidade em experimento prévio e posteriormente foram infectados novamente com (\blacksquare) SE86 não adaptada e (\square) SE86 ácido-adaptada (n=10).....63
- Figura 4: Fotomicrografia de cólon de camundongo infectado com *Salmonella* Typhimurium (A, B) ou *Salmonella* Enteritidis (C até F). Em B, D e F, as bactérias foram ácido-adaptadas. A seta curta indica a ulceração da mucosa, a seta longa indica o infiltrado inflamatório. Em A até D, barra = 50mm, em E e F, barra = 20mm.....65
- Figura 5: Fotomicrografia de ceco de camundongo infectado com *Salmonella* Typhimurium (A, B) ou *Salmonella* Enteritidis (C até F). Em B, D e F, as bactérias foram ácido-adaptadas. A seta curta indica a ulceração da mucosa, a seta longa indica o infiltrado inflamatório. Em A até D, barra = 50 mm, em E e F, barra = 20 mm.....66
- Figura 6: Fotomicrografia de íleo de camundongo infectado com *Salmonella* Typhimurium (A, B) ou *Salmonella* Enteritidis (C até F). Em B, D e F, as bactérias foram ácido-adaptadas. A seta curta indica a ulceração da mucosa, a seta longa indica o infiltrado inflamatório. Em A até D, barra = 50 mm, em E e F, barra = 20 mm.....68
- Figura 7: Fotomicrografia de fígado de camundongo infectado com *Salmonella* Typhimurium (A, B) ou *Salmonella enteritidis* (C até F). Em B, D e F, as bactérias foram ácido-adaptadas. A seta indica o foco inflamatório. Em A até D, barra = 50 mm, em E e F, barra = 20 mm.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lesões macroscópicas morfológicas causadas por SE86 ácido-adaptada e não adaptada e ST99 ácido-adaptada e não adaptada no jejuno e íleo ceco de ratos convencionais artificialmente infectados (n=6).....	58
Tabela 2: Média e Desvio Padrão (logUFC.g ⁻¹) de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE86) e <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST99) ácido-adaptadas e não adaptadas nas fezes, jejuno e íleo-ceco de ratos convencionais artificialmente infectados (n=6).....	59
Tabela 3. Média e Desvio Padrão (logUFC.g ⁻¹) de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE86) e <i>Salmonella</i> Typhimurium (ST99) ácido-adaptadas e não adaptadas nas fezes, jejuno, íleo-ceco e fígado de camundongos gnotobióticos artificialmente infectados (n=3).....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DTA – Doença Transmitida por Alimentos
FGS – Fluido Gástrico Simulado
SE86 – *Salmonella* Enteritidis número 86
ST99 – *Salmonella* Typhimurium ano 1999
LPS – Lipopolissacarídeo
SPI – Ilha de patogenicidade
SPI-I – Ilha de patogenicidade I
ATR – Resposta à tolerância ácida
AR – Resistência ácida
GSR – Resistência generalizada ao estresse
RpoS – fator sigma da RNA polimerase
TG – Trato gastrointestinal
RC – Resistência à colonização
DL₅₀ – Dose letal para matar 50% de uma população
UFC – Unidade Formadora de Colônia
MLN – Linfonodos Mesentéricos
GF – Isento de microrganismos ou “germ-free”
CV – Convencionais
PP – Placas de Peyer's
BHI – Infusão de cérebro e coração
PS – Solução salina
NMP – Número Mais Provável
AVG – Ágar Seletivo Verde-Brilhante
TSI – Três Açúcares e Ferro
LIA – Lisina Açúcar e Ferro
PBS – Solução Salina Tamponada
HE – Hematoxilina-Eosina
SPF – Livres de Patógenos Específicos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	CARACTERÍSTICAS DE <i>Salmonella</i>	15
2.2	SALMONELOSE POR <i>S. Enteritidis</i>	16
2.3	SÍNDROMES CAUSADAS POR <i>Salmonella</i>	19
2.4	MECANISMOS DE PATOGENICIDADE	21
2.5	RESPOSTA DE <i>Salmonella</i> AO ESTRESSE	25
2.6	FLUIDO GÁSTRICO	29
2.7	MICROBIOTA INTESTINAL	31
2.7.1	Função Protetora e Resistência à Colonização	33
2.7.2	Fatores que influenciam a instalação de <i>Salmonella</i>	35
2.8	MODELOS ANIMAIS	36
2.8.1	Animais “germ-free” e gnotobióticos	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	LINHAGENS BACTERIANAS	41
3.2	ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS	41
3.3	ADAPTAÇÃO ÁCIDA	42
3.4	SOBREVIVÊNCIA ÁCIDA EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO	42
3.5	EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	43
3.5.1	Experimentação com ratos	43
3.5.1.1	<i>Preparação do inóculo para infecção dos ratos</i>	44
3.5.1.2	<i>Delineamento experimental</i>	45
3.5.1.3	<i>Pesagem e bem estar geral dos animais</i>	46
3.5.1.4	<i>Eutanásia dos animais</i>	46
3.5.1.5	<i>Lesões morfológicas macroscópicas</i>	47
3.5.1.6	<i>Isolamento e contagem de <i>Salmonella</i> no trato gastrintestinal e fezes</i>	47
3.5.1.7	<i>Descarte dos animais</i>	48
3.5.1.8	<i>Avaliação Ética</i>	49
3.5.2	Experimentação com camundongos	49
3.5.2.1	<i>Preparação do inóculo</i>	50
3.5.2.2	<i>Infecção experimental</i>	50
3.5.2.3	<i>Contagens de <i>Salmonella</i> nas fezes e no trato gastrintestinal</i>	51
3.5.2.4	<i>Determinação da translocação no fígado</i>	51
3.5.2.5	<i>Histopatologia</i>	52
3.5.2.6	<i>Curva de mortalidade</i>	53
3.5.2.7	<i>Análise Estatística</i>	53
4	RESULTADOS	54
4.1	REDUÇÃO DO pH DURANTE A ADAPTAÇÃO ÁCIDA	54
4.2	RESISTÊNCIA ÁCIDA EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO	54
4.3	EXPERIMENTO COM RATOS	57
4.3.1	Peso e comportamento	57
4.3.2	Lesões morfológicas macroscópicas	57
4.3.3	Contagem de <i>Salmonella</i> no trato gastrintestinal e nas fezes	58
4.4	EXPERIMENTO COM CAMUNDONGOS	60
4.4.1	Contagem de bactérias nas fezes	60
4.4.2	Contagem de bactérias no trato gastrintestinal	61

4.4.3	Translocação para o fígado	62
4.4.5	Mortalidade dos Animais	62
4.4.6	Patologia	63
4.4.6.1	<i>Cólon</i>	63
4.4.6.2	<i>Ceco</i>	64
4.4.6.3	<i>Íleo</i>	67
4.4.6.4	<i>Fígado</i>	67
5	DISCUSSÃO	70
6	CONCLUSÕES	81
7	PERSPECTIVAS	82
	REFERÊNCIAS	83
	APENDICE	
	A - FICHA PESO DOS ANIMAIS.....	94
	ANEXO	
	A - MEIOS DE CULTURA, DILUENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS...	95

1 INTRODUÇÃO

Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) constituem um problema bastante freqüente, sendo que um expressivo aumento na notificação destas enfermidades tem ocorrido em diversos países. Dentro deste contexto, *Salmonella* é um importante patógeno alimentar e também uma das bactérias mais estudadas em termos de fisiologia, genética, estrutura celular e desenvolvimento. No Rio Grande do Sul (RS), *Salmonella* sp. tem sido apontada como a principal causa de DTA nos últimos anos. Embora diversos sorovares de *Salmonella* tenham sido isolados de diferentes alimentos, *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis tem sido o principal sorovar envolvido nas salmoneloses alimentares no RS. As razões de praticamente apenas uma cepa desse sorovar ter sido isolada de alimentos envolvidos em surtos alimentares ainda não estão totalmente compreendidas, porém diversas informações a respeito desse microrganismo já estão disponíveis, por exemplo: *Salmonella* Enteritidis foi o microrganismo identificado em 97% dos alimentos envolvidos em salmoneloses de 1999 a 2000 (GEIMBA et al., 2004) e uma cepa específica foi isolada em mais de 92% dos alimentos suspeitos no período de 2001 a 2002 (OLIVEIRA et al., 2007). A mesma cepa sobreviveu mais do que *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* ao congelamento em hambúrguer de frango artificialmente contaminado (SOPENA et al., 2008, *in press*). Esse microrganismo foi mais resistente ao hipoclorito de sódio a 200 e 400ppm comparativamente a *S. Typhimurim* e *S. Bredeney* (MACHADO, 2007). A cinética de crescimento dos mesmos microrganismos também foi avaliada em meio de cultura e em maionese caseira (MALHEIROS; DE PAULA; TONDO, 2007) e a cepa *S. Enteritidis* (SE86) cresceu mais rapidamente nas primeiras 6h do que os demais sorovares. Além

disso, SE86 demonstrou maior capacidade de adaptação ácida e sobrevivência térmica (52°C, 56°C e 60°C) do que *S. Typhimurim* e *S. Bredeney*, indicando maior resistência e potencial de patogenicidade, uma vez dentro de organismos vivos (MALHEIROS et al., 2008, *in press*).

Estudos “in vitro” e “in vivo” têm sido usualmente empregados na investigação dos mecanismos de patogenicidade que envolvem o gênero *Salmonella* (HAVELAAR et al., 2001; MASTROENI; SHEPPARD, 2004; HAPFELMEIER; HARDT, 2005; YUK; SCHNEIDER, 2006). Dentre os estudos mais aplicados pode-se citar a utilização do Fluido Gástrico Simulado (FGS) (YUK; SCHNEIDER, 2006), devido à sua praticidade e reprodutibilidade e a utilização de modelos animais, incluindo principalmente ratos convencionais e camundongos “germ-free”. Tais estudos podem fornecer informações importantes sobre patógenos alimentares e essas informações podem ser úteis no entendimento e possível prevenção de novos surtos alimentares.

Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a sobrevivência da cepa *S. Enteritidis* (SE86) e da cepa *S. Typhimurium* (ST99), ácido adaptadas ou não, em FGS e a capacidade de invasão intestinal destas cepas em dois modelos animais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARACTERÍSTICAS DE *Salmonella*

O gênero *Salmonella* caracteriza-se por compreender bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, móveis por flagelos peritríquios (exceto os sorovares Gallinarum e Pullorum) e são pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Normalmente não fermentam a lactose, são anaeróbios facultativos, produzem ácidos e, freqüentemente, gás a partir de D-glicose e outros carboidratos. São indol negativos, produzem ácido sulfídrico e são capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono. Não hidrolizam uréia e possuem capacidade de descarboxilar lisina e ornitina (DARWIN; MILLER, 1999; HOLT et al., 1994). Resistem à dessecação e ao congelamento, apresentando crescimento numa faixa de 7°C a 45°C o que os torna capazes de sobreviver no ambiente por diversos anos (WILCOCK; SCHWARTZ, 1993), no entanto, a temperatura ideal de multiplicação varia de 35 - 37°C (FRANCO; LANDGRAF, 1996). O pH ótimo de crescimento situa-se entre 6,5 e 7,5, contudo, podem crescer, em pH de 4,5 a 9,0 (TORTORA et al., 2003).

Este gênero vem sofrendo inúmeras modificações, sendo dividido em três espécies, *Salmonella enterica*, *S. bongori* (LEMINOR; POPOFF, 1987; REEVES et al., 1989) e, mais recentemente, *S. subterranea* (SHELOBINA et al., 2004). A espécie *Salmonella enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *houtenae* (CLARKE; GYLES, 1993) e existem atualmente, mais de 2.500 sorovares de *Salmonella* (KANGAS et al., 2007). Estes sorovares geralmente estão presentes no trato gastrintestinal de diversos animais,

incluindo peixes, répteis, pássaros e mamíferos (CLARKE; GYLES, 1993), sendo o homem e os animais vertebrados seus reservatórios primários (JAY, 2000). De acordo com Tortora et al. (2003), *Salmonella* sp. recebeu este nome em homenagem ao seu descobridor Daniel Salmon, que juntamente com Smith descreveu *Salmonella Choleraesuis* como agente etiológico da Peste Suína Clássica. A nomenclatura ainda não foi totalmente definida, devido, especialmente à classificação atual ser baseada em métodos bioquímicos e sorológicos. Atualmente, o esquema de identificação descrito por Kauffman e White divide o gênero em sorovares, tendo por base a composição de seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar).

No homem as salmoneloses não-tifóides, transmitidas mais freqüentemente por *Salmonella* Enteritidis, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Heidelberg*, *S. Newport* e *S. Dublin* (D'AOUST, 1994), são as principais causas de doenças bacterianas transmitidas por alimentos. A enterocolite é o resultado de uma infecção causada por microrganismos não-tifóides e em humanos saudáveis é habitualmente auto-limitante e restrita ao trato gastrointestinal. Em pessoas imunocomprometidas pode ocorrer invasão sistêmica, sendo necessária a utilização de antimicrobianos (CRUCHAGA et al., 2001).

As salmoneloses tifóides e paratifóides caracterizam-se por serem severas infecções sistêmicas causadas por *S. Typhi* e organismos paratifóides relacionados e são também denominadas de febre enterica (D'AOUST, 1994).

2.2 SALMONELOSE POR *S. Enteritidis*

Salmonella é reconhecida como um dos principais microrganismos

causadores de DTA em diversas partes do mundo (LEE et al., 1994), com estimativa de incidência anual de 1,3 bilhões de casos e 3 milhões de mortes (THONG et al., 1995). Na União Européia, o número de casos humanos por *Salmonella* não-tifóide reportados foi maior que 100.000 em 1997 (O'BRIEN; VALK, 2003). Nos Estados Unidos, de acordo com Cohen; Tauxe (1986) e Baird-Parker (1990) existem aproximadamente 40.000 casos de salmoneloses notificados por ano e apenas 1 a 5% das infecções por *Salmonella* são reportadas (CHALKER; BLASER, 1988). A incidência de salmonelose nos Estados Unidos, seguramente aumentou desde a 2ª Guerra Mundial. As razões pelas quais isto ocorreu são complexas e incluem aumento na proporção de indivíduos maiores de 60 anos, mudanças nos métodos agrícolas e de distribuição de alimentos, aumento do consumo de alimentos crus ou insuficientemente cozidos, aumento do número de imunocomprometidos ou pessoas com doenças crônicas e deterioração da infra-estrutura do sistema público de saúde (DARWIN; MILLER, 1999). *Salmonella* é a principal causadora de DTA em humanos em países como Grécia (TASSIOS et al., 1997), Itália (MURESU et al., 2001), França (BOUVET et al., 2002) e Bulgária (ASSEVA; IVANOV; KANTARDJIEV, 2006).

Os sorovares *S. Typhimurium* (ST) e o *S. Enteritidis* (SE) são os mais comumente implicados em infecções humanas, os quais normalmente ocorrem veiculados por alimentos contaminados (BABU et al., 2006).

Até meados da década de 80, *S. Enteritidis* era isolada de humanos e animais com freqüência consideravelmente baixa na maioria dos países (CASTILLA, 2003), porém, no final dessa década ocorreu uma mudança expressiva neste cenário. Isto fez com que a prevalência desse sorovar isolado em infecções humanas ultrapassasse *S. Typhimurium*, que, até então, ocupava o primeiro lugar.

Castilla (2003) relatou que esta mudança foi observada nos países da Europa e, posteriormente, em países das Américas. No Brasil, o primeiro caso conhecido ocorreu em 1981, o qual foi relatado por Mota et al. (1981) na cidade de Curitiba, PR. A partir de 1993, a salmonelose por *S. Enteritidis* tem sido descrita também em outras regiões do país, incluindo o Noroeste do estado de São Paulo, Sorocaba, Campinas e Santo André, sendo responsáveis, na maioria das vezes, por surtos de toxinfecções alimentares esporádicas (PERESI et al., 1998; FERNANDES et al., 2003).

De acordo com dados da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, em 1990 *S. Typhimurium* foi isolada de 86% dos alimentos envolvidos em salmoneloses e não houve relatos envolvendo *S. Enteritidis*, no entanto, no ano de 1993, este sorovar foi encontrado em 64% dos alimentos relacionados aos surtos, enquanto *S. Typhimurium* foi isolada em apenas 4% desses alimentos (GEIMBA et al., 2004). Os mesmos autores, durante o período de 1999 a 2000, também encontraram como principal sorovar proveniente de salmoneloses ocorridas no RS, *S. Enteritidis*. Produtos de origem animal foram, neste caso, os mais freqüentemente envolvidos nessas notificações.

Em um estudo que avaliou dados epidemiológicos de salmoneloses no RS, no período de 1997 a 1999, Costalunga e Tondo (2002) relataram que *Salmonella* spp. foi responsável por 35,7% dos surtos alimentares investigados neste estado. O alimento mais comumente relacionado com os surtos foi a maionese caseira e os principais fatores determinantes dos surtos foram, principalmente, a utilização de matéria-prima sem inspeção, sendo estas na maioria dos casos, ovos e alimentos mantidos à temperatura ambiente. Além disso, este estudo demonstrou que a maioria dos surtos ocorreu dentro de residências e estabelecimentos comerciais.

Nadvorny et al. (2004) relataram que no ano 2000, *Salmonella* foi também a principal causadora de surtos alimentares no RS, sendo 72,2% dos surtos igualmente associados ao consumo de alimentos preparados com ovos, especialmente maionese caseira. Manipulação inadequada dos alimentos e utilização de produtos sem inspeção sanitária constituíram os principais fatores que possibilitaram a ocorrência de salmonelose em 74,2% dos surtos confirmados no RS em 2000.

Oliveira et al. (2007) demonstraram que o sorovar *S. Enteritidis* manteve-se como o principal causador de salmoneloses ocorridas no RS, no período compreendido entre 2001 e 2002, sendo que 92% dos isolados pertenciam a este sorovar.

O aumento repentino no isolamento de *S. Enteritidis* pode ser atribuído ao sucesso das campanhas de erradicação de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, causadoras do tifo aviário e da diarreia bacilar em frangos. Essas campanhas possibilitaram a abertura de um novo nicho ecológico que vem sendo ocupado, desde então, por este sorovar (BÄUMLER; HARGIS; TSOLIS, 2000).

Em vista disso, a investigação de características fisiológicas, moleculares, de resistência e de invasividade dos principais sorovares envolvidos em surtos alimentares assume grande importância, objetivando o maior entendimento desses microrganismos e, se possível, a prevenção de novos surtos.

2.3 SÍNDROMES CAUSADAS POR *Salmonella*

As principais síndromes clínicas associadas às infecções por *Salmonella* incluem a febre entérica, também conhecida como febre tifóide e a gastroenterite. A

febre tifóide é causada por *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi e ocasionalmente por outros sorovares, acometendo somente humanos. É transmitida especialmente por água e alimentos contaminados com material fecal humano. O período de incubação compreende 6h a 48h e as manifestações clínicas incluem febre, dor abdominal, manchas pelo corpo, dor de cabeça, vômito e diarreia ou constipação. Os sintomas podem durar de uma a nove semanas. Crianças menores de 1 ano e pessoas maiores de 60 são mais susceptíveis às manifestações da doença e tendem a apresentar infecção mais severa. Sem tratamento, a mortalidade da febre tifóide é de 10 – 15% (DARWIN; MILLER, 1999; OHL; MILLER, 2001).

As gastroenterites caracterizam-se por serem uma inflamação do epitélio intestinal em que o patógeno penetra no intestino e permanece na lâmina própria, causando sintomas tais como náuseas, vômito e diarreia, febre, dores abdominais e calafrios. Os sintomas normalmente aparecem de 6h até 72h com uma média de 12h a 48h, após a ingestão do alimento contaminado (JAY, 2000). Dores de cabeça, desidratação e prostração também podem ocorrer (EL-GAZZAR; MARTH, 1992). Para *Salmonella* ter sucesso na colonização do hospedeiro e causar gastroenterite, o microrganismo necessita vencer a acidez do estômago, a microflora endógena e a fermentação dos metabólitos bactericidas, além da barreira intestinal (BRUGGENCATE et al., 2005). Segundo Ohl; Miller (2001) *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* infectam ampla variedade de hospedeiros animais, incluindo aves, bovinos e suínos e são capazes de causar enterite em humanos. Mesmo sendo mais brandas que a febre tifóide, as gastroenterites causadas por *Salmonella* apresentam freqüência de ocorrência alta, sendo responsáveis por milhares de mortes todos os anos (FORSYTHE, 2002).

Em modelo murino, dada a adequada combinação entre o patógeno e o hospedeiro, uma infecção sub-letal pode ser estabelecida com a supressão do crescimento bacteriano no sistema reticuloendotelial, até o final da primeira semana. O curso de uma infecção primária subletal de *Salmonella* envolve quatro fases distintas: 1) Alcance do sangue e início do desafio, 2) crescimento exponencial bacteriano, 3) supressão do crescimento bacteriano, 4) invasão dos tecidos (SHEPPARD et al., 2003).

2.4 MECANISMOS DE PATOGENICIDADE

De acordo com Ohi; Miller (2001), o gênero *Salmonella* é encontrado em diversos hospedeiros, sendo que cada um possui propriedades químicas e físicas distintas, como temperatura, pH, osmolaridade e nutrientes. Além disso, em cada novo hospedeiro ocorre um estímulo de uma série de respostas imunes inatas, como por exemplo, as anatômicas epiteliais, a atividade de peptídeos antimicrobianos e a atividade do complemento e fagócitos, que podem atuar contra esse microrganismo.

A importância deste gênero bacteriano se dá não apenas por constituir uma atual ameaça à saúde pública, mas também por representar um atual desafio como modelo para estudos dos mecanismos de patogênese bacteriana (OHL; MILLER, 2001).

O resultado da infecção por *Salmonella* é determinado pelo estado do hospedeiro e pela capacidade invasiva da bactéria. Assim, fatores ambientais e genéticos normalmente determinam a susceptibilidade do hospedeiro, enquanto a capacidade da bactéria é determinada pelos chamados fatores de virulência (ASTEN; DIJK, 2005). Atualmente, os mecanismos moleculares têm se destacado

para determinação dos fatores de virulência. Proteínas envolvendo a sobrevivência e a replicação de *Salmonella* têm sido caracterizadas recentemente. Outros fatores de virulência como plasmídeos, toxinas, fímbrias e flagelos têm sido objetos de estudos por décadas e podem ser denominados como fatores de virulência clássicos (ASTEN; DIJK, 2005). De acordo com esse mesmo autor, a maioria dos genes de virulência de *Salmonella* estão agrupados em regiões, distribuídas no cromossomo, denominadas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI). Além disso, existem genes que têm sido adquiridos por *Salmonella* a partir de outras espécies, por transferência horizontal. Alguns sorovares de *Salmonella* como *S. Arbotusovis*, *S. Choleraesuis*, *S. Dublin*, *S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium* são conhecidos por abrigarem plasmídeos de virulência, entretanto, nem todos os isolados destes sorovares contêm estes plasmídeos (ASTHEN; DIJK, 2005).

Diversos estudos estimam que 10^5 a 10^8 bactérias são necessárias para causar a infecção alimentar, porém a quantidade exata varia de acordo com as linhagens, com o tipo de alimento consumido e com o estado fisiológico do hospedeiro (DARWIN; MILLER, 1999). Segundo Varnam (1991), dependendo do sorovar e do alimento, a dose infectante em pessoas saudáveis pode variar de menos de 10^3 UFC, no caso de sorovares adaptados ao homem, até 10^5 - 10^7 UFC para sorovares não adaptados ao homem. Além disso, em alimentos com elevado conteúdo de gordura e proteína, a dose infectante pode ser menor devido à proteção das células contra o suco gástrico. A exemplo disso, D'Aoust (1985), demonstrou que menos de 10 células de *Salmonella* Typhimurium, em queijo Cheddar, foram suficientes para causar doença.

Apesar de *Salmonella* poder penetrar através da faringe, do aparelho respiratório ou da conjuntiva, este microrganismo entra usualmente no hospedeiro

através da rota oral. Após a ingestão, os microrganismos sobreviventes ao baixo pH do estômago alcançam o intestino, colonizando mais comumente o íleo distal e o ceco (MASTROENI; SHEPPARD, 2004).

Existem, no entanto, fatores que podem afetar a habilidade do microrganismo em se estabelecer, incluindo acidez gástrica, peristaltismo, muco intestinal, lisozima das secreções, lactoferrina no aparelho gastrintestinal e microbiota intestinal. Assim, após um período breve de multiplicação, *Salmonella* invade a mucosa intestinal, particularmente a porção representada pelo íleo, resultando em danos leves e transitórios. Uma vez dentro de células, esta bactéria permanece em um vacúolo e é transportada através do citoplasma, entrando na lâmina própria via endocitose (CLARKE; GYLES, 1993). Os microrganismos são fagocitados, porém não são destruídos pelos macrófagos da lâmina própria (WILCOCK; SCHWARTZ, 1993), isto porque no animal não imune, o conteúdo lisossomal dos macrófagos pode não afetar prontamente *Salmonella* (HIRSH, 1990). Para *Salmonella* sobreviver, a mesma deve ser hábil em resistir aos sistemas destrutivos presentes nos macrófagos, baixo pH, limitação de ferro intracelular e demais defesas (CLARKE; GYLES, 1993).

O sistema imune inato tem papel essencial no desenvolvimento da resposta rápida contra *Salmonella* e, na maioria das infecções subclínicas, pode ser suficiente para controlar a progressão da doença (LALMANACH; LANTIER, 1999). Além disso, a importância dos macrófagos e neutrófilos polimorfonucleares tem sido bem documentada (O'BRIEN; SCHER; FORMAL, 1979). Segundo Clarke; Gyles (1993), após 24h, *Salmonella* é encontrada em grande número dentro dos macrófagos do intestino e tecidos linfóides associados, o que desencadeia o aparecimento de uma reação inflamatória aguda com predominância de macrófagos e danos

microvasculares proeminentes, além de trombose dentro da lâmina própria e submucosa. A reação inflamatória é caracterizada pela presença de grande número de leucócitos polimorfonucleases no intestino e no lúmen intestinal. Nas 24h seguintes as bactérias no lúmen e nos enterócitos são fagocitadas, porém aquelas que estão na lâmina própria persistem e multiplicam-se dentro das células fagocitárias.

De acordo com Ohi; Miller (2001), após as células de *Salmonella* chegarem ao intestino delgado, estes microrganismos atravessam a mucosa intestinal e se aderem às células do epitélio através de diversos mecanismos, especialmente fímbrias que contribuem significativamente para a aderência das bactérias nas células epiteliais (RYCHLIK; BARROW, 2005). Estudos microscópicos revelaram que estes microrganismos invadem as células epiteliais por processos mediados por endocitose bacteriana. Imediatamente após as bactérias aderirem às células apicais da superfície intestinal, ocorrem profundos rearranjos no citoesqueleto das células do hospedeiro, induzindo a subsequente formação de dobras na membrana que englobam a bactéria em grandes vesículas. Este processo de requerer dobramentos na membrana e macropinocitose são induzidos, em muitas células, por fatores de crescimento e por distintos processos morfológicos e funcionais. Além disso, a endocitose mediada por bactérias requer síntese coordenada de múltiplas proteínas bacterianas (OHL; MILLER, 2001).

Segundo Lee; Schneewind (1999), *Salmonella* invade as placas de Peyer via células M, utilizando o sistema de secreção tipo III codificado por genes da ilha de patogenicidade I (SPI-I). A SPI-I codifica a proteína sipB que possibilita a invasão de *Salmonella* pela morte dos macrófagos residentes nas placas de Peyer. Isto é alcançado pela indução da apoptose de macrófagos e localização das bactérias nos

polimorfonucleares (MONACK et al., 2000).

2.5 RESPOSTA DE *Salmonella* AO ESTRESSE

Salmonella sp. é conhecida por apresentar respostas adaptativas induzidas por diversas condições de estresse, incluindo ácidos, sais e temperatura. Esta resposta adaptativa pode aumentar a sobrevivência deste microrganismo em ambientes deletérios (INGRAHAM, 1987 apud LEYER; JOHNSON, 1992).

Uma das mais importantes e estudadas respostas ao estresse em bactérias patogênicas relacionadas com alimentos é conhecida como resposta de tolerância ácida (ATR) (FOSTER; OLIVER; SYLVESTER, 1995; ROWBURY, 1997). São conhecidas pelo menos 11 diferentes tipos de ATR induzidas sob várias condições de crescimento (ROWBURY, 1997), diferindo dos sistemas de resistência ácida (AR) que apenas ocorrem em meios de cultura complexos durante a fase estacionária (LIN et al., 1995). Geralmente os patógenos aumentam sua ATR mediante exposição ao pH ácido em níveis subletais, durante a fase de crescimento exponencial (LEYER; JOHNSON, 1992). Além disso, estes microrganismos apresentam também uma resistência generalizada ao estresse (GSR), a qual é expressa após sua entrada na fase estacionária, resultando em uma AR (resposta ácida) pH-independente e regulada pela RpoS (fator sigma da RNA polimerase) (LIN et al., 1995; CHEVILLE et al., 1996).

As células em fase estacionária podem também exibir um pH-dependente indutor da tolerância ácida (também denominada resistência), aumentando ainda mais o pH-independente da AR (LEE; SLONCZEWSKI; FOSTER, 1994; BUCHANAN; EDELSON, 1999). A fase estacionária da ATR apresenta grande variação entre as espécies (LIN et al., 1995) ou entre linhagens da mesma espécie

(BUCHANAN; EDELSON, 1999) e é relacionada com o tipo de acidulante utilizado para desafiar os microrganismos (RYU; BEUCHAT, 1999).

Foster; Hall (1990) demonstraram que *S. Typhimurium* expressa uma resposta de tolerância ácida quando é exposta a pH de 5 a 6 e esta resposta atua protegendo a célula de outros estresses ácidos maiores. Antes da exposição prévia a estresses sub-letais, respostas podem ser alteradas e condições têm sido encontradas para alterar a tolerância ácida nas enterobactérias (ROWBURY, GOODSON, 1998). Assim, primeiro, existe uma ATR ligada à fase log de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. que são transferidas de um pH inicial de 7,0 para condições levemente acidificadas (pH 4,0 – 6,0), em poucos minutos a 37 °C (FOSTER; HALL, 1990). Em um segundo momento, os microrganismos tornam-se mais ácido-tolerantes, quando cultivados em fase estacionária de crescimento (COOPER; ROWBURY, 1986). Fase esta que se caracteriza por ser complexa, com diversos processos (LEE et al., 1994; LIN et al., 1995). Uma terceira resposta de tolerância ácida também precisa de mudança do pH inicial para pH acidificado e o grau de tolerância induzida por esta mudança passa a ser maior quando em presença de certos íons (ROWBURY, 1997).

A maioria das espécies bacterianas, evidentemente, requer um período de adaptação ácida, que irá finalmente, aumentar a ATR. A adaptação ácida, que é normalmente transitória, adquire interesse maior, especialmente quando a segurança dos alimentos é levada em consideração, porque pode propiciar a sobrevivência de *Escherichia coli* O157:H7 (LEYER; WANG; JOHNSON, 1995), *Salmonella* (LEYER; JOHNSON, 1992) e *Listeria monocytogenes* (GAHAN; O'DRISCOLL; HILL, 1996) em alimentos acidificados. Adicionalmente, espécies de patógenos ácido-adaptados podem exibir proteção cruzada para outras condições

de estresses, como o térmico (LOU; YOSEF, 1997; RYU; BEUCHAT, 1999) e o estresse à irradiação. Existe a hipótese de que a longa sobrevivência de patógenos ácido-adaptados em baixo pH pode aumentar a resistência e a virulência (ARCHER, 1996). Wilde et al. (2000) relataram que a tolerância ácida e térmica de isolados de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis PT4 foi nitidamente mais elevada quando as células foram cultivadas, durante a fase estacionária, em triptona de soja comercial (TSB) ou infusão cérebro-coração (BHI) contendo glicose, do que quando as células foram cultivadas em qualquer caldo nutriente de triptona, durante a incubação por 24h. A redução do pH ocorreu até, aproximadamente, valores de 5,8 - 4,7 durante a incubação por 24h e isso levou a adaptação, que conseqüentemente aumentou a tolerância ácida e térmica.

A complexidade das ATR de bactérias patogênicas tem resultado em variação nas técnicas e terminologias utilizadas para descrever estes fenômenos nos estudos com alimentos. Vários autores têm denominado adaptação ácida a mudança da fase exponencial de crescimento da condição de neutralidade para condições de acidificação subletal ($\text{pH} < 5,8$) por alguns ciclos de crescimento (DAVIS; COOTE; O'BYRNE, 1996; GAHAN; O'DRISCOLL; HILL, 1996; LOU; YOUSEF, 1997). A súbita exposição ao ácido induz rapidamente a um aumento da ATR, conferindo assim uma proteção das células sob condições ácidas letais ($\text{pH} < 4,0$) e ainda a proteção cruzada para outros estresses, em comparação com células não expostas ao ácido. Essa técnica, no entanto, tem demonstrado ser melhor descrita como choque ácido (RYU; BEUCHAT, 1999), em vez de adaptação ácida. Desta forma, a adaptação ácida, como é utilizada, parece ser mais corretamente utilizada para células em crescimento, na fase estacionária, sob condições levemente acidificadas. Um exemplo disso pode ser a adaptação ácida

realizada pelo crescimento de *Salmonella* na fase estacionária em caldo de cultura com pH ajustado em 5,0, a 37°C. A maioria dos genes envolvidos na ATR permanecem com função ainda desconhecida (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001). Sabe-se que a adaptação ácida envolve a expressão de 18 proteínas e serve para proteger e manter o pH em equilíbrio e para manter a viabilidade (GOODSON; ROWBURY, 1989).

Em termos moleculares, um componente chave é induzido na fase estacionária em *Salmonella* spp. Este componente é denominado fator sigma da RNA polimerase (RpoS). RpoS, um fator sigma alternado envolvido na fase estacionária das respostas fisiológicas e de estresse, regula um grupo de sistemas genéticos que contribuem para aumentar a virulência, a resistência térmica e osmótica e a resistência ao estresse oxidativo e, em geral, contribuem para a sobrevivência potencial de *Salmonella* spp. (DODD et al., 1997).

Durante muitos anos, foi concebido que para os microrganismos como *Salmonella* e *Escherichia coli*, as células em fase exponencial, as quais estão se dividindo rapidamente, são mais sensíveis do que quando estão na fase estacionária, em que cessa a divisão celular. Isto é verdade para uma série de transformações sub-letais que as bactérias podem sofrer durante a transformação dos alimentos, como o leve aquecimento, o prejuízo ocasionado pelo ato de congelar-descongelar, o estresse osmótico e ácido e o tratamento biocida (NYACHUBA; DONNELLY, 2005). Esta diferença de sobrevivência potencial tem sido explicada em parte pela ação do componente RpoS, que é maximamente induzido no início da fase estacionária e controla a expressão de uma série de mais de 40 genes e operons. Estes incluem uma série de genes envolvidos na resistência ao estresse, como *otsAB* e *treA* que estão envolvidos na síntese e metabolismo da

trealose e conferem proteção contra o calor e estresse osmótico; *katEG*, os genes que conferem proteção contra a água oxigenada e, conseqüentemente contra o estresse oxidativo; e genes de reparação do DNA como *xthA* e *aidB* que asseguram uma proteção contra uma série de estresses que danificam o DNA. A atividade da proteína RpoS também pode ser induzida em fase exponencial por uma série de fatores de estresses, como a falta de nutrientes, o calor, o choque osmótico e o estresse oxidativo (DODD; RICHARDS; ALDSWORTH, 2007). Assim o fator sigma (RpoS) tem demonstrado produzir uma maior resistência ao estresse em fase estacionária das células de *Salmonella* e *Escherichia coli*, em comparação com aqueles em fase exponencial. Já o trabalho de Dodd; Aldsworth (2002) demonstrou que RpoS pode ser induzido em fase exponencial, em resposta a uma série de processos adversos utilizados na indústria de alimentos, incluindo mudanças na atividade de água e conservantes (DODD; ALDSWORTH, 2002).

O papel do *rpoS* e suas implicações afetam a segurança dos alimentos e tem sido objeto de uma série de estudos nos últimos anos. Desta forma, faz-se necessário o estudo da adaptação e sobrevivência de *Salmonella* em condições de acidez moderadas e intensas, modelo que pode ser reproduzido com auxílio do Fluido Gástrico Simulado (FGS) produzido em laboratório (YUK, SCHNEIDER, 2006) e que simula de forma prática e com poucos inconvenientes o fluido gástrico humano.

2.6 FLUIDO GÁSTRICO

O fluido gástrico tem grande importância como primeira defesa contra patógenos entéricos e pesquisas simulando este fluido têm sido bem documentadas

(SMITH, 2003; TAMPLIN, 2005). O estômago destaca-se por ter um papel fundamental não só na digestão parcial dos alimentos, mas também na inativação e morte de agentes patogênicos presentes nos alimentos antes da sua entrada no trato gastrintestinal (SMITH, 2003). O suco gástrico tem pH 1, com níveis de HCl de 150-160mEq/L (5475-5840mg/L), sendo que o estômago produz 1-2 L de suco gástrico por dia (JOHNSON, 2001).

A resistência ácida dos patógenos pode contribuir para a sua virulência (BERK et al., 2005), propiciando uma proteção cruzada de *Salmonella* contra estresse térmico e osmótico (YUK; SCHNEIDER, 2006). Desta forma, de acordo com Yuk; Schneider (2006), condições moderadas de acidez podem favorecer o desenvolvimento de cepas de *Salmonella* mais resistentes ao fluido gástrico, aumentando o risco de doença, pois estes microrganismos terão maior habilidade para sobreviver à passagem pelo estômago humano. Por outro lado, quando as células são cultivadas sobre condições alcalinas, exibem tolerância ácida reduzida. Portanto, para causar salmoneloses no homem, *Salmonella* precisa invadir as células intestinais, anteriormente sobrevivendo às condições extremas do ácido do estômago, para então alcançar o intestino, fato este, que pode ser facilitado pela prévia adaptação ácida (BENJAMIN; DATTA, 1995; KOO; MARSHALL; DEPAOLA, 2001).

Deste modo, vários fatores genéticos têm sido mostrados como importantes para respostas adaptativas ao ácido em *Salmonella*, além da proteína RpoS, como a PhoP, que produz uma resposta reguladora importante para sobrevivência nos macrófagos e resistência aos peptídeos antimicrobianos; e Fur, uma proteína reguladora do metabolismo do ferro (AUDIA; WEBB; FOSTER, 2001). A resposta de tolerância ácida (ATR) de *S.Typhimurium* é capaz de proteger a célula bacteriana

contra os dois tipos de estresse ácido, orgânicos (ácidos fracos) e inorgânicos (baixo pH) (BAIK et al., 1996; BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998). Reguladores da ATR que estão envolvidos na proteção contra estes dois tipos de estresse ácidos foram identificados no sorovar *S. Typhimurium*, sendo que RpoS e Fur protegem contra o estresse ácido orgânico e PhoP e RpoS atuam na proteção contra estresse de ácidos inorgânicos (BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998).

2.7 MICROBIOTA INTESTINAL

O trato gastrintestinal (TG) representa uma interface entre o indivíduo e seu ambiente externo. Uma barreira intestinal intacta é essencial para manutenção da saúde e prevenção de danos teciduais e de diversas doenças (FARHADI et al., 2003). Além disso, o TG caracteriza-se por ser um complexo ecossistema gerado pela associação do epitélio, sistema imunológico e microbiota residente (McCRACKEN, LORENZ, 2001) especializado nas funções de digestão dos alimentos (estômago e intestino delgado superior), absorção de nutrientes (intestino delgado) e absorção de água e resíduos (intestino grosso) (TANNOCK, 1995).

Estima-se que as comunidades que colonizam o trato gastrintestinal situem-se em torno de 400 espécies, embora estudos mais recentes indiquem que esse número varie de 500 a 1000 espécies (SONNENBURG; ANGENENT; GORDON, 2004; SUZUKI et al., 2007), porém, pesquisas sugerem que somente 30 a 40 destas espécies chegam a atingir níveis dominantes, necessários para exercer funções no ecossistema do hospedeiro que as alojam (VAUGHAN et al., 2000). Além disso, existem cerca de 100 trilhões de células no trato gastrintestinal, que representam 10 vezes o número de células do corpo humano (BERG, 1996). As bactérias comensais

que colonizam este local podem conferir benefícios à saúde do hospedeiro, contribuindo para a digestão e para o desenvolvimento da imunidade intestinal e prevenindo a colonização por agentes patogênicos. Assim, para manter a integridade e a função normal do intestino, um delicado equilíbrio deve ser alcançado entre a microbiota intestinal e sistema imunitário (MAGALHÃES; TATTOLI; GIRARDIN, 2007). Essa microbiota gastrintestinal varia qualitativamente, quantitativamente e metabolicamente, dependendo do local colonizado, da espécie e da idade do hospedeiro, além da localização longitudinal e transversal no trato gastrintestinal (NICOLI, 1995).

Interações entre bactérias e animais têm sido primariamente estudadas em termos de relações patogênicas, no entanto, bactérias também exercem aparentemente, efeitos benéficos, bem como deletérios sobre os hospedeiros animais (McCRAKEN; LORENZ, 2001). O comensalismo refere-se a uma associação entre dois organismos em que uma parte beneficia-se da relação, mas o outro não obtém benefícios nem danos. A relação de microflora normal não é um comensalismo, no entanto, cada parceiro influencia as outras marcadamente (TANNOCK, 1999). Assim, o hospedeiro protege-se da microbiota intestinal residente ou da microbiota indígena – outros termos também utilizados, através de barreiras físicas e químicas formadas pelo epitélio do TG (trato gastrintestinal) (BEVINS; MARTIN-PORTER; GANZ, 1999; O'NEIL et al., 1999). Estas barreiras são reforçadas pela resposta imune adquirida na mucosa (McGHEE; LAMM; STROBER, 1999) de forma que a microbiota normal estimula a resposta imunológica do hospedeiro. Esta resposta será mais rápida quando for desafiada com patógenos. Assim, através do antagonismo, a microbiota normal irá inibir a colonização do TG

por patógenos exógenos, sendo este, o benefício mais importante da presença da microbiota normal.

Certas bactérias passam intactas através do epitélio intestinal de mamíferos adultos, no entanto outras bactérias como *Salmonella* penetram prontamente no epitélio gastrintestinal de roedores e colonizam os linfonodos mesentéricos (TAKEUCHI, 1971). A passagem de matéria particulada ou bactéria do trato gastrintestinal para os vasos linfáticos, sangue ou fígado foi denominada translocação por Hildebrand e Wolochw em 1962 e por Fuller e Jane-Williams em 1970. Já Berg e Garlington (1979) definiram translocação bacteriana, em modelos animais, como sendo a passagem de bactérias viáveis do trato gastrintestinal através da barreira epitelial para os linfonodos mesentéricos e possivelmente para outros órgãos. Os três maiores promotores da translocação bacteriana no TG de modelos animais são: (1) aumento da população bacteriana (ou seja, supercrescimento) no TG, seguido por perturbações na ecologia do TG por uso de antibioticoterapia oral, desnutrição protéica, choque e outras condições, (2) danos físicos na barreira mucosa, como as que ocorrem com isquemia, lesão durante o choque endotóxico e hemorrágico (BERG, 1996) ou (3) diminuição das defesas imunitárias resultante de drogas imunossupressoras ou síndromes como câncer e AIDS (BERG, 1995).

2.7.1 Função Protetora e Resistência à Colonização

Microrganismos aeróbios estão constantemente entrando no aparelho digestivo junto com os alimentos, mas a colonização normalmente é prevenida devido à existência da microbiota autóctone anaeróbia (resistência microbiana à

colonização) e pelos fatores de resistência do próprio hospedeiro (VOLLAARD; CLASENER, 1994). Estudos sobre a interação da microbiota normal e de patógenos entéricos são tratados primeiramente como mecanismos de proteção, que previnem o estabelecimento de infecções entéricas. O fenômeno de antagonismo contra bactérias intestinais patogênicas foi estudado por muitos anos (HENTGES, 1970), sendo que desde 1916 é discutida a possibilidade da microbiota normal do TG ser importante na resistência natural do homem e dos animais contra infecções entéricas (NISSLE, 1916 apud HENTGES, 1970).

Assim, no trato gastrointestinal, a microbiota normal representa a primeira linha de defesa do hospedeiro, seguida pela barreira física do tecido intestinal e finalmente pelo sistema imune do hospedeiro. O sistema ecológico intestinal equilibrado, desta forma, é capaz de exercer no hospedeiro, um efeito que vêm recebendo inúmeras denominações, como efeito barreira, resistência à colonização, interferência bacteriana, antagonismo bacteriano ou exclusão competitiva (BARBOSA et al., 2005). Esse efeito irá prevenir o estabelecimento de microrganismos que não fazem parte desse ecossistema (VAN DER WAAIJ; BERGHUIS-DE VRIES; LEKKERKERK-VAN DER WESS, 1971a), pela produção de bacteriocinas, peróxido de hidrogênio e ácidos orgânicos, competição por nutrientes e por sítios de adesão. Além disso, a presença da microbiota também estimula o peristaltismo, o sistema imune e a maturação e renovação das células epiteliais do cólon (McFARLAND, 2000).

Bactérias potencialmente patogênicas reúnem um número de fatores de resistência. Destes, a resistência à colonização (RC), determina fatores que controlam a densidade de crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos em vários locais do canal alimentar (VAN DER WAAIJ, 1987). O termo

RC foi introduzido por Van Der Waaij; Berghuis-De Vries; Lekkerkerk-Van Der Wess, (1971a) para designar a resistência contra a colonização por microrganismos potencialmente patogênicos exógenos (VAN DER WAAIJ; BERGHUIS-DE VRIES; LEKKERKERK-VAN DER WESS, 1971b; VAN DER WAAIJ; DE VRIES-HOSPERS; WELLING, 1986).

Além de a RC ser fornecida pela microbiota, a mesma é também mediada por fatores anatômicos e fisiológicos, incluindo mucosa intacta, salivagem, ato de engolir, secreção de imunoglobulina A, produção de ácido gástrico, descamação das células da mucosa e motilidade gastrintestinal normal (VAN DER WAAIJ, 1987). Estes fatores antagonizam a adesão de microrganismos nas membranas mucosas e promovem um trânsito gastrintestinal rápido, no entanto, os sistemas de RC não são capazes de manter a concentração de microrganismos potencialmente patogênicos exógenos sob controle, se a microbiota normal estiver ausente ou perturbada (VOLLAARD; CLASENER, 1994).

2.7.2 Fatores que influenciam a instalação de *Salmonella*

A microbiota intestinal e sua relação com o trato digestivo formam um ecossistema susceptível a perturbações, sejam por causas endógenas (estresse) ou exógenas (dieta do hospedeiro e uso de antimicrobianos) que podem influenciar a composição da microbiota intestinal de modo que o hospedeiro fique exaurido ou exposto a formas agudas de má-nutrição e/ou doenças (SAVAGE, 1987). Isto facilita o estabelecimento de várias bactérias que não fazem parte da microbiota normal do TG, provocando gastroenterites.

No entanto, no caso de modelos animais, a microbiota normal do TG dos ratos e camundongos é geralmente reconhecida como causadora de interferência no estabelecimento dos patógenos no hospedeiro (BOHNHOFF; MILLER; MARTIN, 1964). Além da microbiota residente e do sistema imune do hospedeiro, existe uma camada protetora de muco que recobre o trato gastrintestinal, responsável pela lubrificação e transporte entre o conteúdo luminal e o revestimento epitelial (FOSTER; OLIVER; SYLVESTER, 1995) e atua como uma importante barreira contra a invasão sistêmica das bactérias (BARBER; JONES; MINEI, 1991). Para se manterem na camada mucosa, as bactérias teriam que se multiplicar a uma taxa superior à produção do muco e em um fluxo a jusante (VAN DER WAAIJ, 1987).

O principal componente do muco é a mucina, glicoproteína de alto peso molecular, que forma um gel quando suficientemente concentrada. Existem duas categorias de mucinas na superfície das mucosas, aquelas que são ancoradas na membrana e as secretadas (TANNOCK, 1999). As enzimas bacterianas são capazes de degradar a mucina no cólon. Alguns estudos demonstraram que a perda da característica de açúcar de elevado peso molecular no cólon, indica que a mucina é degradada por bactérias, especificamente pela mucinase (TANNOCK, 1999).

2.8 MODELOS ANIMAIS

A avaliação conduzida em culturas de tecido *in vitro* e modelos de infecção com animais de laboratório facilitam os estudos das complexas interações entre patógeno e hospedeiro. Apesar de não representarem modelos perfeitos, que refletem exatamente a infecção humana, eles possibilitam presumir sobre os mecanismos gerais de patogênese bacteriana e imunidade do hospedeiro e são, por

esta razão, considerados indispensáveis para o estudo da rede de interações que ocorrem entre o patógeno e o hospedeiro (OHL; MILLER, 2001; HAMFELMEIER; HARDT, 2005).

Do ponto de vista da adaptação ao estresse ácido, os hospedeiros animais podem ser divididos entre aqueles com maior ou menor complexidade do sistema estomacal. Infecções por *Salmonella* têm sido estudadas em coelhos, cobaias, macacos *Rhesus*, pintos e principalmente em ratos e camundongos (NAUGHTON et al., 1995). Esses estudos têm demonstrado que a colonização e invasão do intestino por *Salmonella* estão associadas com maiores chances de afetar o sistema imunológico deste órgão. Como parte da resposta inflamatória para a infecção há aumento da infiltração linfocitária (NAUGHTON et al., 1995).

De acordo com Mastroeni; Sheppard (2004), os roedores têm sido extensivamente estudados como modelos para o estudo dos mecanismos de patogenicidade e imunidade nas salmoneloses. Este modelo também possibilita sua utilização para análises de base genética da virulência de *Salmonella*, imunogenicidade e para a avaliação inicial de novas gerações de vacinas contra *Salmonella*. A severidade e o resultado da infecção por *Salmonella* em roedores dependem de diversas variáveis, incluindo a virulência da cepa infectante, a dose infectante, a rota de infecção, a base genética e o estado imunológico do hospedeiro. A interação individual entre o hospedeiro e o patógeno resulta em infecções com diferentes graus de severidade e duração, sendo uma ferramenta útil para estimar as diversas manifestações clínicas das salmoneloses em humanos. No entanto, a flexibilidade da utilização de roedores como modelos aumenta a necessidade de interpretações cuidadosas dos resultados, porque há uma relativa importância de diferentes mecanismos imunológicos que podem ser grandemente

influenciados pela projeção experimental.

Em modelo murino, linhagens de *S. Typhimurium* induzem uma infecção fatal semelhante à febre entérica e servem como modelo experimental de infecção sistêmica por *Salmonella* (OHL; MILLER, 2001). Bitar; Tarpley (1985) e Sashinami; Yamamoto; Nakane (2006), também reportaram que *S. Typhimurium* causa infecções sistêmicas em ratos com patogenicidade similar à febre tifóide em humanos, com mecanismos importantes de adesão à mucosa, invasão das células epiteliais e desencadeamento de uma secreção fluida que causa sintomatologia de diarreia.

O principal sítio de invasão de *Salmonella* é o íleo terminal (CARTER; COLLINS, 1974; HOHMANN; SCHMIDT; ROWLEY, 1978), as placas de Peyer (PP) e as células M do intestino delgado, permitindo que a mesma chegue aos linfonodos mesentéricos (MLN) e, em seguida, ao baço e ao fígado (CARTER; COLLINS, 1974). Camundongos infectados com *S. Typhimurium* apresentam sinais típicos de doença como temperatura elevada, entre 4 e 8 dias após a inoculação oral, mas não desenvolvem diarreia (ZHANG et al., 2003). O genótipo dos roedores desempenha papel crítico na sensibilidade para o efeito letal em salmoneloses sistêmicas induzidas por *S. Typhimurium*.

Em ratos, de acordo com Ohl; Miller (2001), *Salmonella* apresentam-se aderidas preferencialmente nas células M do epitélio intestinal, entretanto, a invasão dos enterócitos também ocorre. Adicionalmente à invasão do epitélio intestinal, o sorovar *S. Enteritidis* induz a produção de uma secreção responsável pelo recrutamento inicial e transmigração de neutrófilos no lúmen intestinal. Atravessando o epitélio intestinal, as células de *Salmonella* encontram outros obstáculos de imunidade inata, representados pelos macrófagos da submucosa. A migração de

fagócitos infectados para outros órgãos do sistema reticuloendotelial provavelmente facilita a disseminação da bactéria no hospedeiro (OHL; MILLER, 2001).

Devido ao modelo murino convencional, com microbiota já estabelecida, apresentar freqüentemente considerável discrepância nos resultados especialmente de contagens microbianas, justamente por caracterizar um modelo biológico com todas as variações inerentes a este tipo de modelo, os animais “germ-free” aparecem como excelentes modelos para se estudar a relação patógeno-hospedeiro. Devido à grande similaridade entre cada animal e suas peculiaridades inerentes por não possuírem microbiota normal associada ou sistema imunológico completamente desenvolvido, esses animais têm apresentado vantagens sobre os roedores convencionais no estudo de patógenos microbianos.

2.8.1 Animais “germ-free” e gnotobióticos

O modelo que mais tem fornecido informações sobre o papel do desenvolvimento bacteriano no hospedeiro é o que utiliza animais “germ-free” (GF), também denominados de animais isentos de microrganismos. Animais GF foram estudados desde a derivação de uma cobaia GF em 1895, porém como resultado da insuficiência nutricional das primeiras dietas esterilizadas, a perpetuação de colônias de roedores GF não ocorreu até finais dos anos 40 (WOSTMANN, 1996). Outros animais também foram estudados no estado GF, incluindo bezerros, cabras, galinhas, suínos e cães, mas, devido ao seu tamanho e genética, roedores GF têm servido como o principal modelo de animais isentos de microrganismos. Animais criados sob condições isentas de microrganismos apresentam muitas características morfológicas e fisiológicas que os distinguem de animais criados em um ambiente

microbiológico normal (animais convencionais ou CV) (McCRACKEN; LORENZ, 2001).

Animais GF possuem o sistema imunológico pouco desenvolvido. Em virtude disto, certas bactérias podem alcançar altos níveis populacionais no trato gastrointestinal devido à ausência de uma microbiota antagonista (BERG, 1980). A expressão axênico é sinônima de GF. Animais definidos como gnotobióticos são aqueles colonizados por uma ou mais espécies bacterianas conhecidas, ou seja, é aquele que está associado a organismos conhecidos pelo pesquisador (SMITH; McCOY; MACPHERSON, 2007). Já animais convencionais (CV) são aqueles mantidos em ambiente aberto nos biotérios, normalmente encontrados nos laboratórios de pesquisa (GORDON; PESTI, 1971; PLEASANTS, 1974).

Os animais GF não são isentos de estímulos antigênicos, pois há antígenos na dieta, nos excrementos de outros animais da mesma gaiola e seus próprios (WOSTMANN et al. 1981 apud NARDI, 1989). Assim, estudos com animais GF têm sido conclusivos, mostrando que a microbiota normal é necessária para completar a maturidade intestinal, particularmente, para o desenvolvimento de um sistema imunitário plenamente funcional.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS BACTERIANAS

Foram utilizadas cepas de *Salmonella enterica* de dois sorovares distintos. Um dos sorovares utilizados nos experimentos foi de *S. Enteritidis* (cepa SE86) proveniente de um surto de salmonelose ocorrido no Rio Grande do Sul, em 1999, o qual foi investigado pela Vigilância Sanitária do RS e isolado pelo Laboratório Central do RS (FEPPS/IPB/LACEN/RS). O microrganismo em questão foi genotipificado por Geimba et al. (2004) e apresentou o mesmo perfil genotípico das linhagens de *S. Enteritidis* envolvidas na maioria dos surtos (mais de 90%) de salmonelose ocorridos entre o período de 1999 a 2002, no Rio Grande do Sul (OLIVEIRA, 2007). A SE86 foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Mercedes Passos Geimba, da Faculdade de Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC/RS). A outra cepa utilizada neste trabalho foi *S. Typhimurium* (ST99), isolada em 1999, a partir de fezes de suínos. Esse microrganismo foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Marisa Cardoso, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

3.2 ARMAZENAMENTO DAS CULTURAS BACTERIANAS

Ambas as cepas foram mantidas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Merck, Darmstadt, Alemanha) adicionado de 50% (v/v) de glicerol estéril (Difco, Lawrence, EUA), sob temperatura de -15°C. As culturas para os experimentos realizados com maior frequência, foram mantidas em placas contendo BHI, armazenadas a 4°C e

subcultivadas em tubos de ensaio contendo ágar BHI inclinado, incubadas a 37°C por 24h, antes dos experimentos.

3.3 ADAPTAÇÃO ÁCIDA

A adaptação ácida foi efetuada de acordo com o método descrito por Malheiros et al. (2008, *in press*). Para isto, os microrganismos foram cultivados, separadamente, em BHI adicionados de 10g.L⁻¹ de glicose (BHIG), a fim de permitir uma redução gradual do pH e possibilitar a adaptação ácida após 18h de incubação a 37°C. Após a incubação, o pH da cultura foi medido usando um medidor de pH modelo TM 125 Schott (Handylab 1, Alemanha). Cada sorovar foi também incubado em BHI sem glicose, nas mesmas condições, produzindo células de *Salmonella* consideradas nesse trabalho, não adaptadas.

3.4 SOBREVIVÊNCIA ÁCIDA EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO

A sobrevivência de *Salmonella* ácido-adaptadas e não adaptadas foi avaliada utilizando Fluido Gástrico Simulado (FGS) de acordo com Beumer; De Vries; Rombouts (1992). A formulação do FGS consistiu de 8,3g.L⁻¹ de proteose-peptona (Fisher Diagnostics, Middletow, EUA), 3,5g.L⁻¹ de D-glicose (Merck, Darmstadt, Alemanha), 2,05g.L⁻¹ de NaCl (F. Maia, Cotia, SP), 0,6g.L⁻¹ de KH₂PO₄ (Merk, Darmstadt, Alemanha), 0,11g.L⁻¹ de CaCl₂ (Reageb, RJ, Brasil), 0,37g.L⁻¹ de KCl (Merk, Darmstadt, Alemanha), 0,05g.L⁻¹ de Ox bile (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,1g.L⁻¹ de lisozima (MP Biomedicals, Illkirch, França) e 13,3mg.L⁻¹ de pepsina (Nuclear, Diadema, Brasil). O pH final foi ajustado para 1,5 com uma solução 5,0N

de HCl esterilizado (Merk, Darmstadt, Alemanha). Todos os compostos foram autoclavados separadamente, exceto a ox bile, a lisozima e a pepsina, que foram esterilizadas separadamente por filtração - 0,2mm, filtro em seringa (Fisher, EUA), seguidos de mistura asséptica de todos os componentes. O inóculo inicial possuía uma densidade aproximada de $9 \log\text{UFC.mL}^{-1}$, obtida pelo crescimento do microrganismo em 5mL de caldo BHI e BHIG, separadamente, e incubados a 37°C , por 18h. Então, tubos contendo 9mL de FGS foram inoculados com cerca de $9 \log\text{UFC}$ de *Salmonella* ácido-adaptadas e não adaptadas, separadamente. Antes da inoculação, o FGS foi mantido em banho-maria aquecido a 37°C , por uma hora. A sobrevivência das células de *Salmonella* ácido-adaptadas e não adaptadas foi quantificada em 0s, 20s, 40s, 60s, 80s e 100s. Para isto, diluições decimais foram efetuadas em 9mL de água peptonada estéril e alíquotas de $100\mu\text{L}$ foram semeadas pelo método de espalhamento em BHI suplementado com 0,1% de piruvato de sódio (Nuclear, Diadema, Brasil) (LEYER, JOHNSON, 1992). As contagens foram realizadas após a incubação a 37°C , por 24h, e foram expressas em UFC.mL^{-1} , sendo a média e o desvio padrão calculados com base nos resultados de quatro repetições de cada experimento. O limite inferior de detecção de sobrevivência ácida foi $1,0\log\text{UFC.mL}^{-1}$ (SAMELIS, IKEDA, SOFOS, 2003).

3.5 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

3.5.1 Experimentação com ratos

Foram utilizados trinta ratos Wistar (*Rattus norvegicus*), machos, com idade entre 6 e 9 semanas (HAVELLAR et al., 2001), mantidos individualmente em gaiolas de 23cm^3 , supridos com água potável e ração animal comercial *ad libitum*,

em temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade entre 65% e 70%, com períodos alternados de 12h de claro e escuro. Os ratos foram obtidos de uma colônia do Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil e foram transportados até o Biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da mesma Universidade, onde foram realizados os experimentos. Os animais foram mantidos entre uma e duas semanas para adaptação ao ambiente, previamente à inoculação dos microrganismos (HAVELAAR et al., 2001). Todos os animais foram alimentados com dieta convencional (Nuvital, Colombo, Paraná) até 30h antes da inoculação. Após a inoculação, a mesma dieta foi mantida por quatro dias. Os ratos foram pesados em intervalos de dois dias e o comportamento foi avaliado diariamente. Os animais foram monitorados quanto à presença de *Salmonella* nas fezes antes dos experimentos e o resultado foi negativo para todos os ratos.

3.5.1.1 Preparação do inóculo para infecção dos ratos

Culturas contendo aproximadamente 9 logUFC de SE86 ácido-adaptada e não adaptada e ST99 ácido-adaptada e não adaptada foram centrifugadas a 5000g, por 10min. O fluido sobrenadante foi descartado e o “pellet” foi suspenso em 1mL de solução salina fisiológica (PS), seguido de nova centrifugação. O sobrenadante foi descartado novamente e o “pellet” foi suspenso em 1mL de PS e centrifugado. Após o descarte do sobrenadante, o “pellet” foi suspenso em 250 μL de PS e adicionado de 250 μL de uma solução de NaHCO_3 6% (v/v). Após a administração nos animais, o restante do inóculo foi transportado para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos e submetido à contagem microbiológica

pelo método de espalhamento em ágar BHI e as placas foram incubadas a 37°C/24h, para confirmação do número de células (HAVELAAR et al., 2001 modificado).

3.5.1.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi totalmente casualizado, de forma que os animais utilizados foram distribuídos de forma aleatória nos cinco grupos a seguir:

- a) Grupo 1, Controle: Composto por seis (6) animais que receberam somente água ao invés do inóculo bacteriano;
- b) Grupo 2, *S. Enteritidis*: Composto por seis (6) animais que receberam inóculo de 9 logUFC de SE86 não adaptada;
- c) Grupo 3, *S. Typhimurium*: Composto por seis (6) animais que receberam inóculo de 9 logUFC de ST99 não adaptada;
- d) Grupos 4 e 5, grupos de seis animais cada, inoculados com a mesma concentração e linhagens descritas acima, porém cada cepa foi induzida à adaptação ácida pelo crescimento em BHI suplementado com glicose.

Os ratos foram inoculados com uma única dose contendo os microrganismos, separadamente (NAUGHTON et al., 1995; HAVELAAR et al., 2001).

O número de animais utilizados no presente experimento foi devidamente calculado pela fórmula 1:

$$R \geq 2(t_0 + t_1)^2 s^2/d^2 \quad (1)$$

Onde:

R = número de repetições necessárias por tratamento por grupo,

t₀ = valor *t* de Student's associados com o tipo de Erro I,

t_1 = representa o valor t de Student's associado com o tipo de Erro II (t_1 = ao valor t tabulado para a probabilidade $2[1-P]$, onde P representa a probabilidade de detectar uma diferença de tamanho de classe, se existir),

s^2 = média de erro ao quadrado do experimento atual,

d = representa a diferença entre os tratamentos que desejam ser detectados (BERDTSON, 1990).

3.5.1.3 Pesagem e bem estar geral dos animais

Os animais foram pesados a cada dois dias desde a fase de adaptação até um dia antes da eutanásia. A ingestão de alimento também foi monitorada e anotada, bem como o comportamento dos animais, observando-se sinais de prostração, diarreia, pêlos eriçados e redução dos movimentos. As fezes foram macroscopicamente avaliadas e microbiologicamente testadas (HAVELAAR, 2001).

3.5.1.4 Eutanásia dos animais

Depois de inoculados, os ratos foram observados por 5 dias e após 30h de privação alimentar, para esvaziar o conteúdo intestinal, foram sacrificados através da aplicação de anestésico Cloridrato de Ketamina (Vetanarcol® - König, Argentina, 50mg/kg) associado a Cloridrato de Xilazina (Rompum® - Bayer, Brasil, 5mg/kg) intraperitonealmente (SAFATLE et al., 2002).

3.5.1.5 Lesões morfológicas macroscópicas

A necropsia foi realizada através de uma incisão pela linha Alba, sendo o abdômen e o tórax inspecionados e o trato gastrintestinal removido. Lesões macroscópicas morfológicas (pontos de necrose do tecido, anormalidades macroscópicas localizadas, aspectos da mucosa, volume e coloração externa) no segmento intestinal foram anotadas e quantificadas. O intestino delgado foi removido assepticamente da cavidade abdominal dos ratos. Duas porções (de aproximadamente 15cm cada) de jejuno a partir do piloro e da junção íleo-ceco foram retirados para estudos histológicos. Posteriormente, porções de 7 a 17cm do jejuno a partir do piloro e de 7 a 17cm da junção íleo-ceco foram utilizados para estimar o número de bactérias nestas porções do trato gastrintestinal (NAUGHTON et al., 1995). As lesões macroscópicas morfológicas foram quantificadas utilizando-se a seguinte escala: (-) nenhuma anormalidade observada; (+) pequena - um, dois ou três pontos de anormalidade macroscópica observada; (++) moderada - quatro, cinco ou seis pontos de anormalidade observada; (+++) severa - sete, oito ou nove pontos de anormalidade observada. Os dados foram tabulados individualmente para cada animal.

3.5.1.6 Isolamento e contagem de *Salmonella* no trato gastrintestinal e fezes

A contagem de *Salmonella* foi efetuada com base em Dufrene et al. (2001). Foram obtidas amostras de 1g das duas porções do trato gastrintestinal e 1g de fezes de cada animal. As amostras do trato gastrintestinal foram homogeneizadas separadamente em água peptonada, utilizando Ultra Turrax IKA T25 – Basic (Janke

and Kankel, Alemanha), durante 10s a 20.000rpm (NAUGHTON et al., 1995; HAVELAAR, 2001). 1 g de cada amostra de fezes foi homogeneizado e diluído em 99mL de água peptonada tamponada (p/v). Amostras de 10mL, 1mL e 0,1mL foram distribuídas em três séries de três tubos e incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24h. Após, 0,1mL de cada tubo foi transferido para tubos contendo 10mL de caldo Rappaport Vasiliadis (Merk, Darmstadt, Alemanha) e incubados a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24-48 h. Após a incubação, uma alçada de cada tubo foram estriadas sobre placas de petri com Ágar Seletivo Verde Brilhante (AVG, Himedia, Mumbai, Índia), suplementados com 0,04% de novabiocina (Merk, Darmstadt, Alemanha). Placas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24–48 h. Colônias típicas foram isoladas e confirmadas através de testes bioquímicos em Ágar Trílice Açúcar Ferro (TSI) (Himedia, Mumbai, Índia), Ágar Lisina Ferro (LIA) (Himedia, Mumbai, Índia), Ágar Citrato de Simmons (Merk, Darmstadt, Alemanha) e Ágar Uréia (Himedia, Mumbai, Índia) baseados em MacFaddin (2000). Para auxiliar na identificação de algumas colônias também foi utilizado Ágar Rambach (Merk, Darmstadt, Alemanha). A quantificação de *Salmonella* foi calculada usando a tabela do número mais provável (NMP) baseado em Food Drug and Administration (FDA) (1992).

3.5.1.7 Descarte dos animais

Todas as carcaças dos animais utilizados no experimento, bem como as fezes coletadas, foram descartadas em sacos plásticos apropriados e incinerados no Forno da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

3.5.1.8 Avaliação Ética

O projeto deste trabalho foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS (CEP/UFRGS) e aprovadas em reunião n. 6, ata n. 86, de 10/05/2007, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

3.5.2 Experimentação com Camundongos

Trinta e oito camundongos (*Mus musculus*) “germ-free” com idade entre 21-23 dias da raça NHI Swiss (Taconic, Germantown, EUA) foram utilizados para estudar a colonização/invasão e mortalidade pelos dois sorovares de *Salmonella* já descritos anteriormente sem ter a interferência da microbiota normal. Os animais foram mantidos em isoladores plásticos flexíveis (Standard Safety Equipment Co., McHenry, EUA) e manuseados de acordo com procedimentos previamente estabelecidos (Pleasants, 1974) no Laboratório de Experimentação com Animais “Germ-Free” UFMG/Belo Horizonte. Experimentos com camundongos gnotobióticos - assim denominados após a infecção com microrganismo(s) sabidamente conhecido(s) - foram conduzidos fora dos microisoladores (UNO Roestvaststaal, B.V., Zevenaar, The Netherlands). Água e ração comercial autoclavável (Nuvital, Colombo, PR) foram esterilizadas em autoclave a 121°C por 15min a 1atm de pressão e administradas *ad libitum* para todos os animais. Todos os procedimentos realizados foram efetuados de acordo com as normas estabelecidas no National Research Council (1996).

3.5.2.1 Preparação do inóculo

Os inóculos de SE86 e ST99 foram preparados a partir de uma colônia isolada, previamente selecionada em meio BHI, a qual foi repicada para tubos contendo 5mL de caldo BHI (Merck, Darmstadt, Alemanha) adicionados ou não de glicose, para indução ou não da adaptação ácida, a 37°C/24h. Posteriormente, foram retirados 100µL da cultura bacteriana e colocados novamente em 5mL de caldo BHI e incubados a 37°C/24h. Diluições decimais em solução salina estéril foram realizadas até a concentração de aproximadamente 10² UFC, que foi posteriormente inoculada nos animais através de gavagem. A contagem bacteriana do inóculo foi realizada em triplicata em Ágar McConkey (Difco, Detroit, EUA).

3.5.2.2 Infecção experimental

Uma única dose 0,1mL contendo aproximadamente 10² UFC de SE86 ácido-adaptada e não adaptada e de ST99 ácido-adaptada e não adaptada, foi utilizada separadamente, para inoculação nos animais “germ-free” pela via intragástrica. Foram utilizados 5 grupos com 6 camundongos em cada grupo, sendo o Grupo 1, identificado como o grupo controle, em que os camundongos foram inoculados apenas com água esterilizada e manipulados com frequência, a fim de demonstrar que a inoculação e a manipulação, apesar de gerarem estresse nos animais, não causam mortalidade; Grupo 2, em que os camundongos foram inoculados com SE86 não adaptada. O Grupo 3 foi inoculado com SE86 ácida-adaptada. Os grupos 4 e 5 foram inoculados com ST99 não-adaptada e adaptada, respectivamente. Os animais foram observados diariamente por um período de até 12 dias, sendo que três

animais de cada grupo foram sacrificados no 3º dia para as contagens microbiológicas e três animais foram mantidos para verificar previamente a sobrevivência, antes da realização do experimento da curva de mortalidade.

3.5.2.3 Contagens de Salmonella nas fezes e no trato gastrintestinal

Fezes frescas foram obtidas assepticamente dos camundongos gnotobióticos, no primeiro e no terceiro dia após infecção, enquanto as duas porções do trato gastrintestinal (jejuno e íleo-ceco) dos animais foram obtidas somente por ocasião da eutanásia, no terceiro dia de infecção, quando os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical. As fezes foram pesadas e maceradas em solução salina tamponada (PBS) (1:10, p/v). As duas porções do trato gastrintestinal foram homogeneizadas separadamente, utilizando um Ultra Turrax IKA T10 – Basic (Janke and Kankel, Alemanha), durante 10s a 20.000rpm. Diluições decimais foram preparadas e alíquotas de 100µL foram semeadas em Ágar MacConkey. As colônias foram contadas após incubação a 37°C, por 24h. Os resultados foram expressos como o valor médio da contagem viável de *Salmonella* ($\log\text{UFC.g}^{-1}$) de três repetições.

3.5.2.4 Determinação da translocação no fígado

Após a eutanásia dos camundongos gnotobióticos, o fígado foi coletado em condições assépticas em capela de fluxo laminar, sendo posteriormente dissecado, pesado, triturado com auxílio de macerador, homogeneizado em solução PBS estéril e submetido a diluições decimais, para a determinação dos níveis de translocação

de SE86 e ST99 ácido-adaptadas e não adaptadas. Em seguida, alíquotas de 100µL foram semeadas em Ágar MacConkey e as colônias foram contadas após incubação 37°C, por 24h. Todos os experimentos de translocação foram realizados em 3 animais de cada grupo, realizando-se a eutanásia antes do início das mortes por infecção.

3.5.2.5 Histopatologia

Amostras do fígado e de porções do intestino delgado – cólon, ceco e íleo foram obtidas cuidadosamente de três animais de cada grupo e submetidas a exame anatomopatológico. As amostras foram fixadas com solução tamponada de paraformaldeído 4% e processados por inclusão e microtomia em parafina. As secções histopatológicas (3-5µm) foram coradas com Hematoxilina/Eosina (HE). Imagens foram obtidas utilizando uma microcâmara JVC TK-1270/RGB e um programa analisador de imagens KS 300 Software da Kontron Elektronik/Carl Zeiss Image Analyzer (Oberkochen, Alemanha). Os fragmentos das amostras foram identificados por códigos e observados seqüencialmente por uma mesma patologista (Profa. Dra. Denise Carmona Cara Machado, do Laboratório de Neuro-Imuno Patologia Experimental, NIPE, do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais), que não teve acesso ao significado dos códigos. As amostras foram decodificadas somente após o laudo ter sido emitido pela patologista.

3.5.2.6 Curva de mortalidade

O experimento para inferir a taxa de mortalidade foi realizado através da construção de uma curva de mortalidade com 2 grupos de 10 animais cada, apenas para um dos sorovares, ou seja, aquele que apresentou mortalidade no experimento prévio, com 3 animais em cada grupo. O experimento consistiu na anotação diária do número de animais para construção da curva de mortalidade. Os dois grupos de 10 animais foram designados como: Grupo SE86 não-adaptada e Grupo SE86.

3.5.2.7 Análise Estatística

Valores para as médias logarítmicas e os desvios padrões das contagens bacterianas foram calculados com base no pressuposto da distribuição lognormal de microrganismos. As curvas de sobrevivência dos dois microrganismos não adaptados e dos dois microrganismos ácido-adaptados foram construídas em \log_{10} número de sobrevivência contra o tempo, no caso do FGS. Todos os dados das contagens microbianas foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) pelo Microsoft Excel (Microsoft Corp. Redmond, EUA) e as médias foram comparadas, utilizando-se, quando necessário, o teste t de Tukey, através do programa Statistica versão 7.0, 2005. Comparações para estimar maior ganho de peso e pontos de lesões macroscópicas foram realizadas através do programa Sisvar para Windows versão 4.0, pela técnica dos contrastes ortogonais e quando necessário foi utilizado o teste F. Para todos os testes, $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

4.1 REDUÇÃO DO pH DURANTE A ADAPTAÇÃO ÁCIDA

A fermentação de glicose pelos sorovares de *Salmonella* que cresceram em BHIG resultou em redução de pH e isso foi utilizado para promover a adaptação ácida. O valor do pH do BHIG estéril foi de $7,06 \pm 0,06$, enquanto o valor final do pH após o crescimento de SE86 e ST99 foi de $4,78 \pm 0,12$ e $4,48 \pm 0,02$, respectivamente. Esses valores foram encontrados após 18h de cultivo, quando os microrganismos estavam na fase estacionária. O pH do BHI estéril, antes da inoculação dos microrganismos, foi de aproximadamente $7,11 \pm 0,20$, e, após o crescimento de SE86 e ST99, apresentou um valor final de pH de $6,25 \pm 0,10$ e $6,55 \pm 0,08$, respectivamente. Com base nos resultados obtidos, a partir do crescimento dos sorovares de *Salmonella* em BHIG, estes foram considerados ácido-adaptados, enquanto os sorovares de *Salmonella* cultivados em BHI foram considerados não adaptados.

4.2 RESISTÊNCIA ÁCIDA EM FLUIDO GÁSTRICO SIMULADO

Após a exposição ao choque ácido em FGS, as populações iniciais de $8,8 \log\text{UFC.mL}^{-1}$ e $8,6 \log\text{UFC.mL}^{-1}$ de SE86 e ST99 não adaptadas foram reduzidas para $6,3 \log\text{UFC.mL}^{-1}$ e $4,5 \log\text{UFC.mL}^{-1}$, respectivamente, após 20s de exposição ao FGS. Estas reduções nas contagens foram de $2,5 \log\text{UFC.mL}^{-1}$ para SE86 e $4,1 \log\text{UFC.mL}^{-1}$ para ST99. Levando em consideração todo o tempo de exposição avaliado, a redução das populações dos dois sorovares não adaptados foi claramente mais intensa durante os primeiros 20s (Figura 2). Após 40s, 60s, 80s e

100s de exposição, as populações dos sorovares foram gradualmente reduzidas e não diferiram significativamente ($p < 0,05$) quando ambos os microrganismos foram comparados (Figura 1).

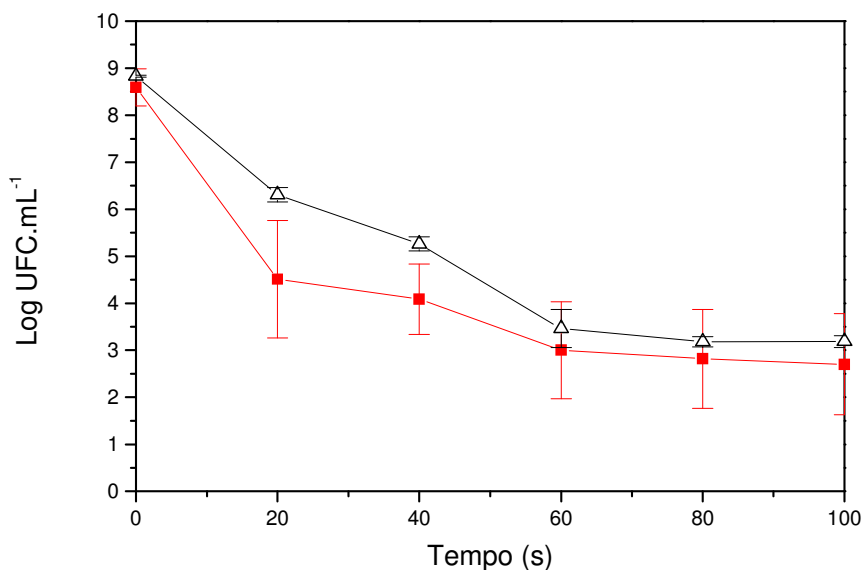


Figura 1: Redução Logarítmica de *Salmonella* Enteritidis (Δ SE86) e *Salmonella* Typhimurium (\blacksquare ST99) não adaptadas durante a exposição em Fluido Gástrico Simulado (FGS), com pH 1,5. Cada ponto foi representado pelo desvio padrão da média ($n=4$).

Como pode ser observado na Figura 2, SE86 ácido-adaptada apresentou maior sobrevivência que ST99 ácido-adaptada em FGS, em todos os tempos analisados. As populações iniciais de aproximadamente $8,8 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ de SE86 e ST99 ácido-adaptadas foram reduzidas para $7,3 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ e $6,0 \log \text{UFC.mL}^{-1}$, após 20s de exposição, respectivamente. Na exposição por 40s, 60s, 80s e 100s, a contagem de SE86 ácido-adaptada foi de 6,3; 5,3; 4,2 e 3,4 $\log \text{UFC.mL}^{-1}$, enquanto a ST99 ácido-adaptada apresentou contagens de 4,3; 3,6; 3,0 e 2,5 $\log \text{UFC.mL}^{-1}$, respectivamente.

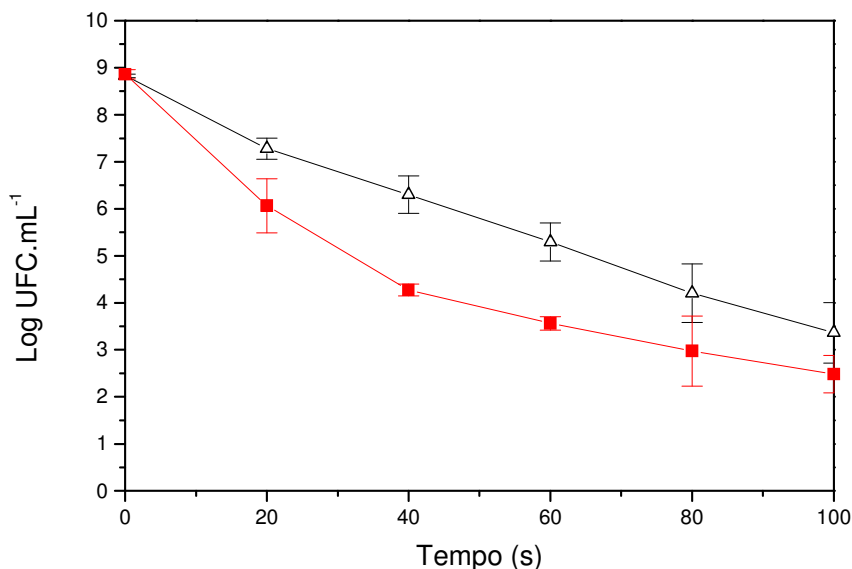


Figura 2: Redução Logarítmica de *Salmonella* Enteritidis (Δ SE86) e *Salmonella* Typhimurium (\blacksquare ST99) ácido-adaptadas durante a exposição em Fluido Gástrico Simulado (FGS) com pH 1,5. Cada ponto foi representado pelo desvio padrão da média (n=4).

Comparando os resultados apresentados na Figura 1 e Figura 2, pode-se observar que SE86 ácido-adaptada apresentou maior sobrevivência que SE86 não adaptada, sugerindo um efeito da glicose sobre a adaptação ácida. Todavia, a adaptação ácida não influenciou nos níveis de sobrevivência de ST99, uma vez que as reduções de *Salmonella* ácido-adaptada e não adaptada foram similares ($p < 0,05$).

Após 100s de exposição em SGF, SE86 ácido-adaptada apresentou 3,4 logUFC.mL⁻¹ de sobrevivência, enquanto ST99 ácido-adaptada apresentou uma contagem de sobreviventes de 2,4 logUFC.mL⁻¹. Essa sobrevivência foi significativamente diferente ($p < 0,05$), o que demonstrou haver diferenças na sobrevivência após a adaptação ácida entre os sorovares estudados.

4.3 EXPERIMENTO COM RATOS

4.3.1 Peso e comportamento

O peso dos animais convencionais foi anotado e monitorado (Apêndice A), sendo que, no início dos experimentos os mesmos variaram de 151,5g a 252,7g e, após aproximadamente 10d (um dia antes da eutanásia) os ratos apresentaram pesos que variaram de 168,5g a 264,4g. Embora todos os animais tenham apresentado ganho de peso durante o experimento, animais infectados com ST99 ganharam menos peso que os animais infectados com SE86. A adaptação ácida dos microrganismos não influenciou no ganho de peso dos animais.

Em geral, os animais apresentaram-se prostrados freqüentemente após dois ou três dias de infecção, sofrendo redução de reflexos e movimentos. O comportamento geral foi típico de animais doentes, no entanto, nenhum dos animais desenvolveu diarreia, como era o esperado para animais convencionais.

4.3.2 Lesões morfológicas macroscópicas

A patologia foi avaliada pela observação de lesões morfológicas macroscópicas (enterite) no segmento intestinal dos ratos convencionais. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 1, SE86 não adaptada foi responsável por nenhuma ou pequena enterite nos seis animais expostos. Por outro lado, SE86 ácido-adaptada, ST99 não adaptada e ST99 ácido-adaptada demonstraram enterites em grau moderado a severo, caracterizadas por elevada contagem de pontos de lesões macroscópicas morfológicas nas zonas do trato gastrintestinal na forma de

manchas esbranquiçadas mais espessas, em regiões pontuais das porções observadas do trato gastrointestinal.

Tabela 1: Lesões macroscópicas morfológicas causadas por SE86 ácido-adaptada e não adaptada e ST99 ácido-adaptada e não adaptada no jejuno e íleo-ceco de ratos convencionais artificialmente infectados (n=6).

Inóculo	Classes de severidade	
	Jejuno	Íleo-ceco
Controle	-(6)	-(6)
SE86 não adaptada	-(2) / +(4)	-(2) / +(4)
SE86 ácido-adaptada	++(4) / +++(2)	++(5) / +++(1)
ST99 não adaptada	++(4) / +++(2)	++(4) / +++(2)
ST99 ácido-adaptada	++(3) / +++(3)	++(4) / +++(2)

Classes de severidade de enterite: - ausência, + leve, ++ moderada, +++ severa. Os números entre parênteses representam a quantidade de animais que apresentaram determinada classe de severidade de enterite.

A severidade de enterite foi classificada de acordo com as contagens de lesões morfológicas no trato gastrointestinal dos ratos sendo:

(-/+) Ausência de enterite ou enterite leve: Pontos de lesões variaram de nenhum a três pontos;

(++/+++) Enterite moderada a severa: Pontos de lesões variaram de quatro a nove pontos;

(+++ / +++) Enterite Severa: Pontos de lesões variaram de sete a nove pontos.

4.3.3 Contagem de *Salmonella* no trato gastrointestinal e nas fezes

SE86 e ST99 foram capazes de colonizar o trato gastrointestinal dos ratos e foram encontradas em diferentes regiões do intestino, após cinco dias de infecção. Considerável número de células de *Salmonella* foi encontrado nas fezes e no trato gastrointestinal, especificamente na junção íleo-cecal e no jejuno. Em geral, a contagem de *Salmonella* nas fezes variou de 1,9 logUFC.g⁻¹ a 4,0 logUFC.g⁻¹

(Tabela 2). SE86 e ST99 não adaptadas foram recuperadas em maior quantidade nas fezes do que os sorovares ácido-adaptados ($p < 0,05$), sugerindo que esses últimos microrganismos não foram excretados nas fezes porque possivelmente colonizaram/invadiram o trato gastrointestinal dos animais. As contagens de SE86 e ST99 ácido-adaptadas não diferiram significativamente.

Nas duas porções do trato gastrointestinal analisadas (jejuno e junção íleo-ceco), as contagens permaneceram entre $2,7 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$ e $3,7 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$. A contagem de SE86 ácido-adaptada na junção íleo-cecal foi significativamente maior que a contagem de SE86 não adaptada, e também maior que a contagem de ST99 ácido-adaptada, demonstrando maior capacidade infectiva da SE86. Não houve diferença significativa na contagem de fezes no jejuno e íleo-ceco de SE86 e ST99 não adaptadas. Entretanto, quando as contagens nas fezes de SE86 e ST99, ambas ácido-adaptadas, foram comparadas com as contagens encontradas nas duas porções do trato gastrointestinal, a quantidade de bactérias no íleo-ceco foi maior que a encontrada nas fezes ($p < 0,05$), sugerindo influência da adaptação em glicose na colonização/invasão do íleo-ceco.

Tabela 2: Média e Desvio Padrão ($\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$) de *Salmonella* Enteritidis (SE86) e *Salmonella* Typhimurium (ST99) ácido-adaptadas e não adaptadas nas fezes, jejuno e íleo-ceco de ratos convencionais artificialmente infectados (n=6)

Inóculo	Contagem de <i>Salmonella</i> viável ($\log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$)		
	Fezes	Jejuno	Íleo-ceco
Controle	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
SE86 não adaptada	3,2±1,0	2,9±0,4	2,9±0,4
SE86 ácido-adaptada	1,9±0,3	3,0±0,2	3,7±0,5
ST99 não adaptada	4,0±0,8	3,0±0,7	3,0±0,9
ST99 ácido-adaptada	1,9±0,0	2,7±0,5	2,7±0,2

4.4 EXPERIMENTO COM CAMUNDONGOS

4.4.1 Contagem de bactérias nas fezes

A coleta para contagem microbiológica das fezes e das duas porções do trato gastrointestinal dos camundongos gnotobióticos foi efetuada apenas no primeiro dia pós-infecção, uma vez que no segundo dia, os animais apresentaram diarreia profusa. Na ocasião da eutanásia dos animais, no 3º dia de infecção, foram colhidas fezes novamente.

As contagens microbiológicas das fezes dos animais, tanto no primeiro dia pós-infecção, quanto no terceiro, situaram-se em torno de $9 \log_{10} \text{UFC.g}^{-1}$, independentemente do sorovar e do tratamento (ácido-adaptadas ou não). Quando foram comparadas SE86 ácido-adaptada com SE86 não adaptada e ST99 ácido-adaptada com não adaptada, as contagens não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) no primeiro e nem no terceiro dia pós-infecção. Quando foram comparadas apenas SE86 e ST99 ácido-adaptadas no primeiro dia pós-infecção, encontraram-se diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), porém para estes mesmos tratamentos no terceiro dia pós-infecção, não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de *Salmonella* eliminada nas fezes (Tabela 3).

Tabela 3. Média e Desvio Padrão ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$) de *Salmonella* Enteritidis (SE86) e *Salmonella* Typhimurium (ST99) ácido-adaptadas e não adaptadas nas fezes, jejuno, íleo-ceco e fígado de camundongos gnotobióticos artificialmente infectados (n=3).

Inóculo	Contagem de <i>Salmonella</i> viável ($\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$)				
	Fezes		Jejuno	Íleo-Ceco	Fígado
	Dia 1	Dia 3			
Controle	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
SE86 não adaptada	10,2±0,4	9,6±0,3	8,0±1,0	9,2±0,8	4,7±0,4
SE86 ácido-adaptada	9,7±0,2	9,5±0,4	6,7±0,7	9,1±0,5	5,0±0,8
ST99 não adaptada	9,34±0,2	9,8±0,0	7,2±1,2	9,3±0,3	4,7±1,2
ST99 ácido-adaptada	9,3±0,0	9,7±0,0	7,2±0,2	9,0±0,7	0,0±0,0

4.4.2 Contagem de bactérias no trato gastrointestinal

A média das contagens bacterianas encontradas no jejuno de camundongos gnotobióticos foi de 7,3 $\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$ e no íleo-ceco 9,1 $\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$ (Tabela 3). As contagens no jejuno dos animais infectados com SE86 não adaptada e ácido-adaptada foi, respectivamente, de 8,0±1,0 e 6,7±0,7 $\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$, enquanto que para o íleo-ceco as contagens foram de 9,2±0,8 e 9,1±0,5 $\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$, para SE86 ácido-adaptada e não adaptada. Para ST99 não adaptada e ácido-adaptada as contagens foram de 7,2±1,1 e 7,2±0,2 $\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$ para jejuno, enquanto que para a junção íleo-ceco os valores de colonização atingiram 9,3±0,3 e 9,0±0,7 $\log_{10}\text{UFC.g}^{-1}$, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as contagens no jejuno e no íleo-ceco, comparando-se SE86 ácido-adaptada e não adaptada, ST99 ácido-adaptada com não adaptada, SE86 com ST99 ambas ácido-adaptadas, e somente SE86 e ST99 não adaptadas entre si, em cada porção do trato gastrointestinal, separadamente.

4.4.3 Translocação para o fígado

As contagens de SE86 não adaptada no fígado apresentaram média de $4,8 \pm 0,4 \log \text{UFC.g}^{-1}$, enquanto que para SE86 ácido-adaptada a média das contagens foi de $5,0 \pm 0,8 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Para ST99 não adaptada os níveis médios de translocação no fígado encontrados foram de $4,7 \pm 1,2 \log \text{UFC.g}^{-1}$ (Tabela 3). A média geral das contagens situou-se em torno de $4,8 \log \text{UFC.g}^{-1}$ com exceção das contagens de ST99 ácido-adaptada, onde não foram isolados os microrganismos no fígado. Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas, conseqüentemente, quando foram comparadas ST99 ácido-adaptada e não adaptada e entre ambos os sorovares ácido-adaptados.

4.4.4 Mortalidade dos Animais

O experimento da curva de mortalidade foi realizado apenas para os grupos de animais gnotobióticos que apresentaram mortalidade no experimento anterior. No grupo 2 (inoculado com SE86 não adaptada) e no grupo 3 (inoculado com SE86 ácido-adaptada) os animais começaram a apresentar mortalidade no quarto e sexto dia, respectivamente. O grupo 4 (inoculado com ST99 não adaptada) e o grupo 5 (inoculado com ST99 ácido-adaptada) não demonstraram mortalidade em até 12 dias no experimento prévio com três animais, sendo os mesmos sacrificados ao final deste período. Estes últimos animais não apresentaram qualquer sintoma da doença. A partir destes dados foi construída a seguinte curva de mortalidade (Figura 3).

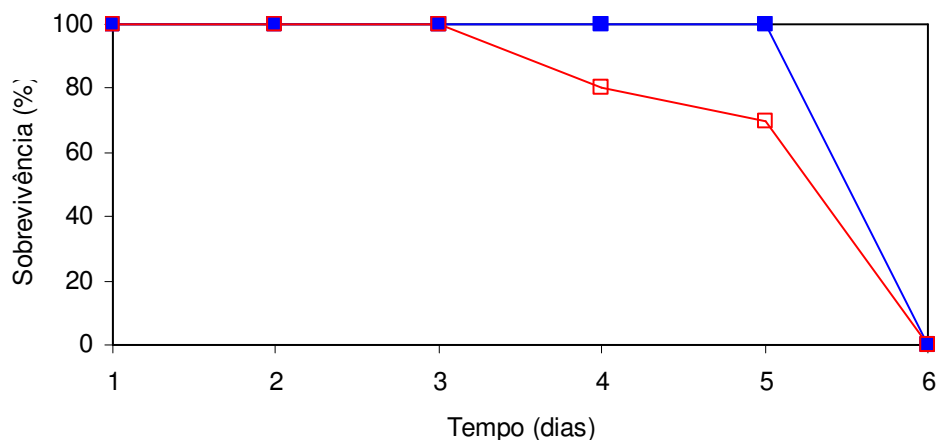


Figura 3. Sobrevivência de camundongos gnotobióticos NHI Swiss nos dois grupos que apresentaram mortalidade em experimento prévio e posteriormente foram infectados novamente com (■) SE86 não adaptada e (□) SE86 ácido-adaptada (n=10).

Pela observação da curva, pode-se visualizar que os camundongos infectados com SE86 ácido-adaptada começaram a morrer no 4º dia de infecção, apresentando também mortalidade no 5º e no 6º dia, enquanto nos animais inoculados com SE86 não adaptada, a mortalidade ocorreu apenas no 6º dia de infecção, sugerindo um efeito importante da glicose na possível ativação da virulência/patogenicidade da SE86.

4.4.5 Patologia

4.4.5.1 Cólon

O cólon dos camundongos infectados com ST99 ácido-adaptadas ou não adaptadas apresentou-se dentro dos parâmetros de normalidade, ou seja, com o epitélio íntegro, glândulas intactas e de tamanho normal. Por outro lado, a infecção

com SE86, tanto ácido-adaptadas quanto não adaptadas, levou a uma intensa ulceração, depleção de células caliciformes e necrose da mucosa, evidenciando a ausência de glândulas em grandes partes da mucosa. Nesta e na submucosa observou-se intenso infiltrado inflamatório constituído por neutrófilos e principalmente macrófagos. Todas as lesões foram caracterizadas como intensas, não havendo diferença entre os tratamentos com ou sem glicose (Figura 4).

4.4.5.2 Ceco

Não foi observada lesão no ceco dos animais infectados com ST99 independente da adaptação ou não em glicose, no entanto, a infecção com SE86 ácido-adaptadas e não adaptadas levou à lesão intensa da mucosa e submucosa dos camundongos, com grandes áreas de necrose e infiltrado inflamatório. O infiltrado foi marcado principalmente por neutrófilos e macrófagos. Todas as lesões foram caracterizadas como intensas, não havendo diferença quanto à adaptação-ácida ou não adaptação (Figura 5).

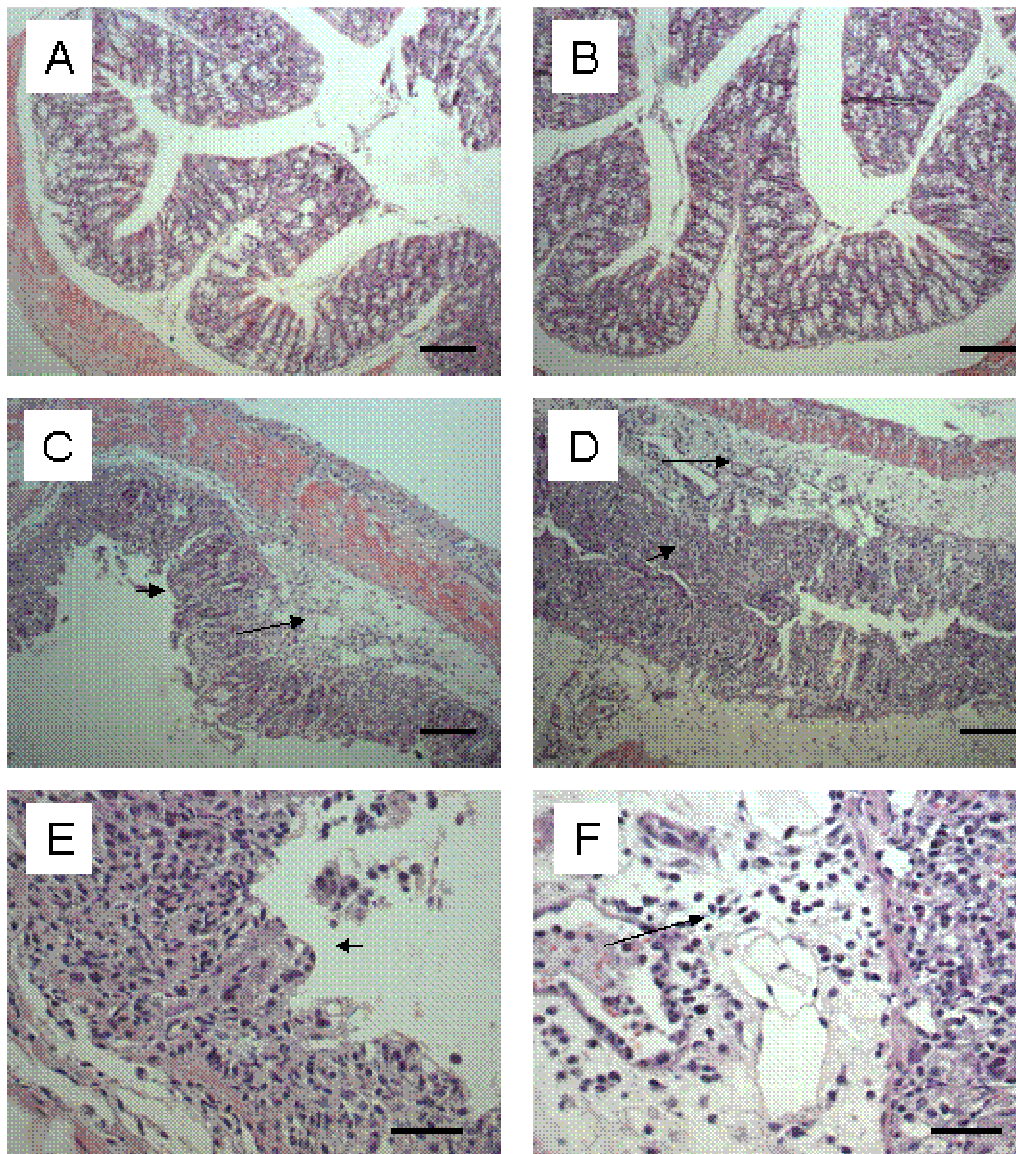


Figura 4. Fotomicrografia de cólon de camundongo infectado com *Salmonella* Typhimurium (A, B) ou *Salmonella* Enteritidis (C até F). Em B, D e F, as bactérias foram ácido-adaptadas. A seta curta indica a ulceração da mucosa, a seta longa indica o infiltrado inflamatório. Em A até D, barra = 50mm, em E e F, barra = 20mm.

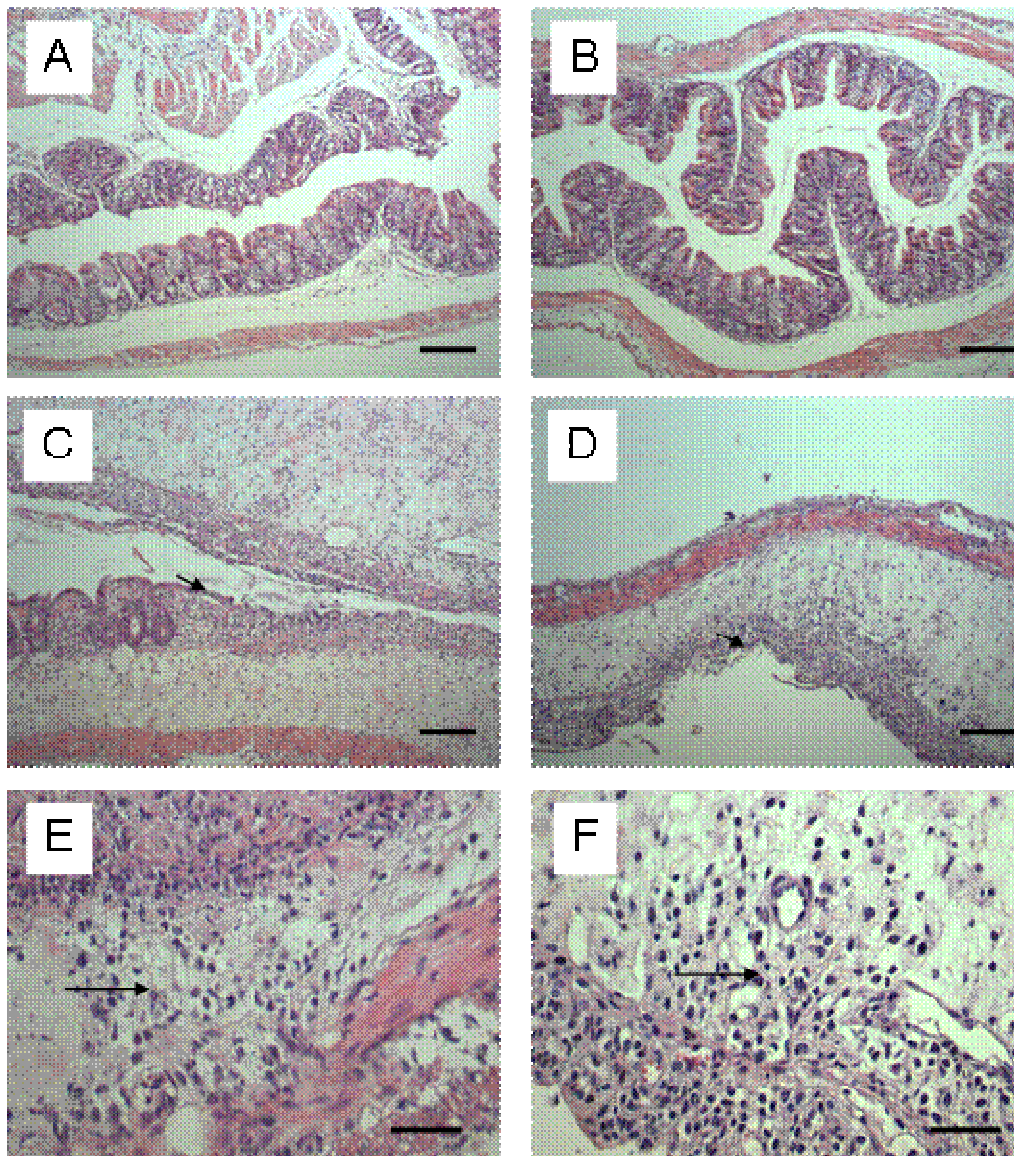


Figura 5. Fotomicrografia de ceco de camundongo infectado com *Salmonella* Typhimurium (A, B) ou *Salmonella* Enteritidis (C até F). Em B, D e F, as bactérias foram ácido-adsaptadas. A seta curta indica a ulceração da mucosa, a seta longa indica o infiltrado inflamatório. Em A até D, barra = 50 mm, em E e F, barra = 20 mm.

4.4.5.3 Íleo

A infecção com ST99 ácido-adaptada e não adaptada lesou as partes apicais da mucosa do íleo, embora as glândulas da parte basal tenham permanecido preservadas. A infecção com SE86, independente se ácido-adaptada ou não, lesou de forma intensa a mucosa do íleo gerando áreas com ulceração, necrose e infiltrado inflamatório intenso, predominantemente neutrofílico em todos os segmentos analisados. Todas as lesões foram caracterizadas como intensas (Figura 6).

4.4.5.4 Fígado

O fígado dos camundongos infectados com SE86 apresentou vasos congestionados, áreas de necrose e muitos focos inflamatórios com macrófagos e neutrófilos independente do sorovar ter sido ácido-adaptado ou não adaptado. Para ST99 não foi observada alteração, sugerindo menor capacidade de virulência causada por este sorovar (Figura 7).

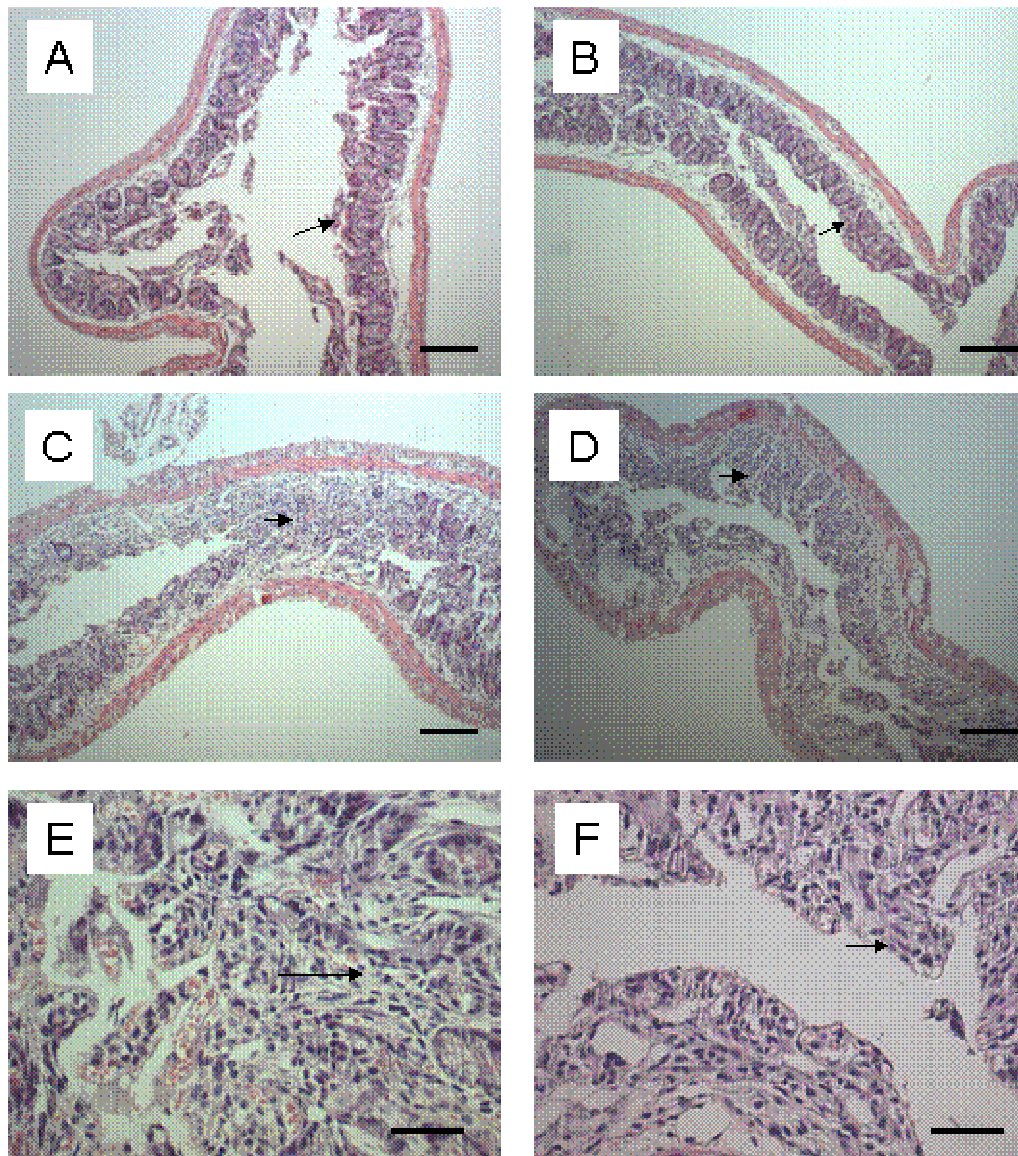


Figura 6. Fotomicrografia de íleo de camundongo infectado com *Salmonella* Typhimurium (A, B) ou *Salmonella* Enteritidis (C até F). Em B, D e F, as bactérias foram ácido-adsaptadas. A seta curta indica a ulceração da mucosa, a seta longa indica o infiltrado inflamatório. Em A até D, barra = 50 mm, em E e F, barra = 20mm.

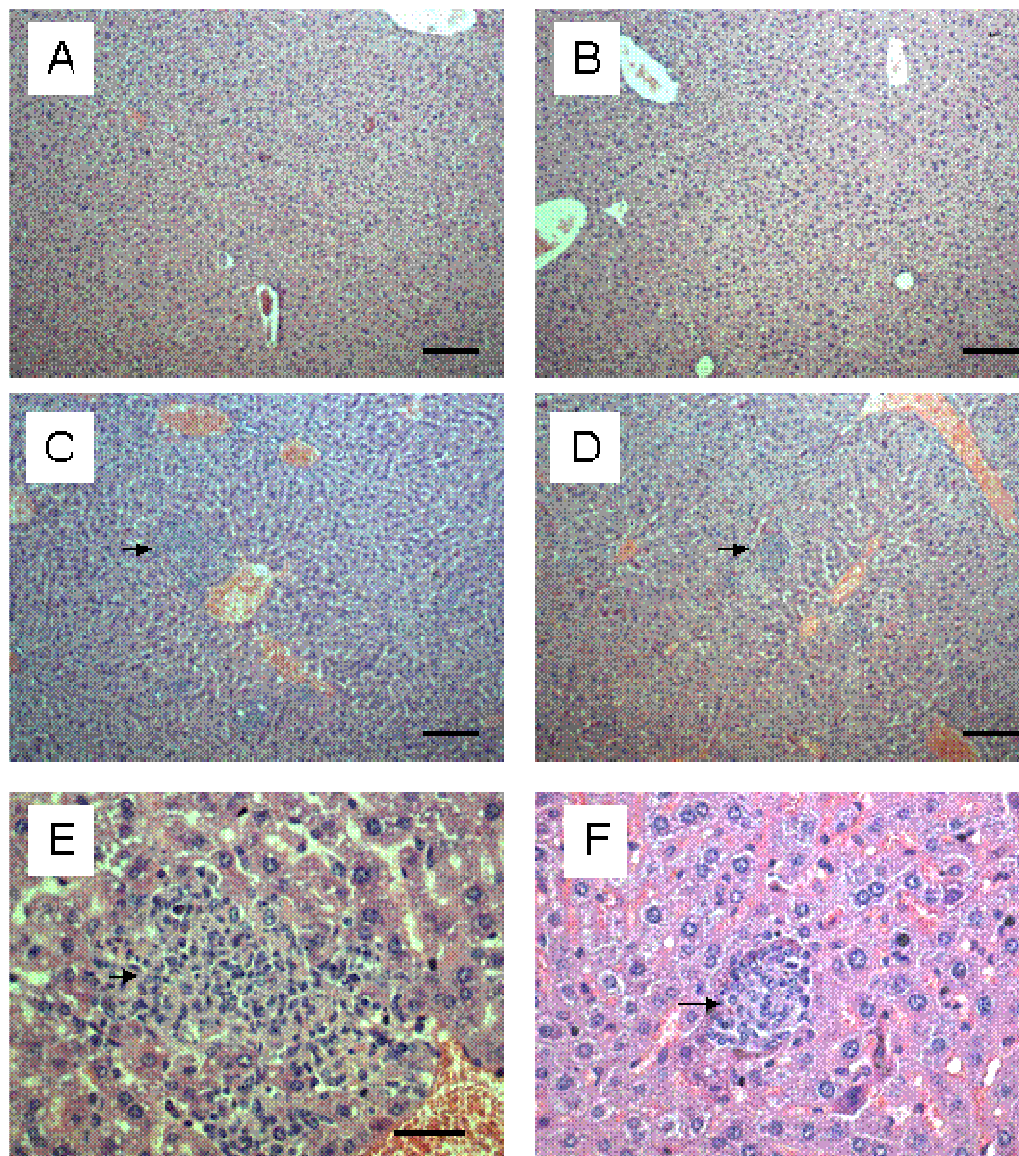


Figura 7. Fotomicrografia de fígado de camundongo infectado com *Salmonella* Typhimurium (A, B) ou *Salmonella* Enteritidis (C até F). Em B, D e F, as bactérias foram ácido-adaptadas. A seta indica o foco inflamatório. Em A até D, barra = 50 mm, em E e F, barra = 20 mm.

5 DISCUSSÃO

A importância do fluido gástrico em humanos e outros animais como primeira defesa contra patógenos entéricos tem sido bem documentada (SMITH, 2003; TAMPLIN, 2005). O estômago tem um papel fundamental na digestão parcial dos alimentos e também na inativação de patógenos microbianos (SMITH, 2003). O fluido gástrico apresenta pH aproximado de 1,0 e é produzido em quantidades de 1L a 2L por dia, os quais são suficientes para inativar muitos patógenos microbianos (JOHNSON, 2001). Baseado nisso, a resistência ácida de patógenos veiculados por alimentos pode ser uma importante ferramenta no desenvolvimento da sua virulência e sobrevivência nos hospedeiros. Por exemplo, para causar surtos alimentares em humanos, células de *Salmonella* devem sobreviver às condições extremas de acidez do estômago antes de alcançar o intestino (BENJAMIN; DATTA, 1995; KOO; MARSHALL; DEPAOLA, 2001). A sobrevivência desses microrganismos pode ser facilitada pela proteção promovida pela matriz do alimento ou pela resistência ácida natural ou adquirida por parte dos microrganismos.

No presente estudo, o decréscimo de pH foi observado após o crescimento da *Salmonella* em BHI suplementado com glicose (BHIG). O pH final do BHIG após o crescimento de SE86 e ST99 foi de 4 a 5, sugerindo que a exposição a pH mais baixos, demonstra a promoção da adaptação ácida. Segundo Samelis; Ikeda; Sofos (2003), quando células são expostas a decréscimos de pH graduais, em condições de acidez moderadas, as mesmas podem tornar-se ácido adaptadas.

Muitos relatos têm relacionado a adaptação ácida com a mudança no crescimento exponencial da cultura pela neutralização subletal das condições ácidas (pH<5,8) por poucos ciclos de crescimento (DAVIS; COOTE; O'BYRNE, 1996;

GAHAN; O'DRISCOLL; HILL, 1996; LOU; YOUSEF, 1997). Samelis; Ikeda; Sofos (2003) relataram que a exposição das células ao ácido induziu rapidamente ao acréscimo na resposta à tolerância ácida (ATR), conferindo assim proteção ao patógeno em condições ácidas letais (pH <4,0). No presente estudo, essa estratégia foi utilizada para induzir a adaptação ácida de sorovares de *Salmonella* antes da exposição a um choque ácido em FGS com pH 1,5 e foi investigado se essa possível adaptação poderia promover proteção às células. Os resultados demonstram que SE86 ácido-adaptadas sobreviveram mais em FGS do que SE86 não adaptadas, indicando um efeito de proteção das células submetidas à adaptação ácida previamente ao choque ácido em FGS. O mesmo efeito não foi observado na sobrevivência de ST99, uma vez que a inativação de ST99 ácido-adaptadas foi similar as ST99 não adaptadas. Yuk; Schneider (2006) também utilizaram a fermentação da glicose para indução da adaptação ácida de sorovares de *Salmonella* expostos a FGS com pH 1,5. Os resultados demonstraram que as linhagens de *Salmonella* não adaptadas foram completamente inativadas após 40s e 60s de exposição a FGS, enquanto as linhagens ácido-adaptadas sobreviveram mais que 80s e *S. Gaminara* ácido adaptada sobreviveu por 100s. Comparativamente aos resultados do presente estudo, houve sobrevivência das duas linhagens ácido-adaptadas analisadas (SE86 e ST99) pelo mesmo período de tempo, ou seja, 100s, no entanto, a sobrevivência de SE86 ácido-adaptada foi 1 logUFC.g⁻¹ maior que a sobrevivência de ST99 ácido-adaptada, sugerindo que SE86 ácido-adaptada apresentou melhor capacidade de adaptação ácida que ST99.

Mecanismos de proteção que permitam uma resposta adaptativa para a exposição a baixos pH foram demonstrados em vários microrganismos, inclusive *Salmonella* (FOSTER, 2000). Assim, a presença de células bacterianas viáveis,

aliada à resistência antimicrobiana de muitas bactérias patogênicas, demonstra a importância da preparação adequada dos alimentos durante o cozimento (BACON et al., 2003). Isto é necessário para que mecanismos como a resistência à acidez subletal, que podem ser induzidos durante a preparação de alguns tipos de alimentos, venham ocasionar um aumento na sobrevivência e resistência e, conseqüentemente, na virulência de microrganismos potencialmente patogênicos nos alimentos.

Berk et al. (2005) estudaram a variação de resistência ácida entre *S. Typhimurium* fagotipo DT104 provenientes de fontes humanas e não humanas e classificaram as linhagens de acordo com seus níveis de resistência ácida após exposição em pH 2,5, por 2h, da seguinte forma: resistência ácida alta (níveis de sobrevivência >10%), resistência ácida intermediária (níveis de sobrevivência <10% e >0,01%) e resistência ácida baixa (níveis de sobrevivência <0,01%). Os resultados revelaram que dentre as linhagens analisadas, seis apresentaram resistência ácida elevada, 14 linhagens foram consideradas de resistência ácida intermediária e 19 linhagens de baixa resistência ácida. Além disso, todas as linhagens com resistência ácida elevada foram isoladas de seres humanos, enquanto que linhagens isoladas de amostras alimentares foram ligeiramente menos ácido-resistentes. Se a mesma classificação fosse aplicada aos microrganismos analisados no presente trabalho, os microrganismos testados (SE86 e ST99) exibiriam uma resistência ácida reduzida até 100s de exposição ao FGS, porque os níveis de sobrevivência foram menores do que 0,0001% para ST99 ácido-adaptada e menores do que 0,0004% para SE86 ácido-adaptada.

Nos experimentos “in vivo”, foi utilizada a neutralização gástrica do ácido do estômago dos ratos por uma solução de bicarbonato de sódio e jejum noturno

(HAVELAAR et al., 2001). Essa técnica foi utilizada com o objetivo de aumentar a chance de sobrevivência dos sorovares de *Salmonella* e para alcançar melhores resultados sem ter a influência do ácido gástrico dos ratos, diminuindo a variação das contagens microbianas. Conseqüentemente, a dose resposta relacionada com a exposição da gavagem intragástrica de *Salmonella* nos ratos foi bem reproduzida, embora tenham sido registrados alguns desvios padrões expressivos nas contagens de *Salmonella*. Estes resultados estão de acordo com outros estudos que utilizaram a inoculação de microrganismos em animais (NAUGHTON et al., 1995; HAVELAAR et al., 2001) que apresentaram variações expressivas nas contagens microbianas. Essas variações podem ser explicadas pelo fato de que muitos fatores podem desempenhar um papel na resistência do hospedeiro à infecção bacteriana. Por exemplo, parte dos inóculos introduzidos pela boca de animais pode ser inativada pelo suco gástrico do estômago (MILLER; BOHNHOFF, 1962). Além, disso, no intestino delgado, as bactérias invasoras podem apresentar menor taxa de multiplicação, porque elas o atravessam rapidamente, entrando no intestino grosso, fazendo assim com que patógenos como *Salmonella* encontrem um ambiente suficientemente antagônico para prevenir a multiplicação e o início da infecção em muitos ratos normais (BOHNHOFF; MILLER; MARTIN, 1964).

De acordo com os resultados do presente estudo, em relação aos pontos de lesões macroscópicas morfológicas, SE86 não adaptada não foi capaz de causar enterite moderada ou severa nos ratos em oposição a SE86 ácido-adaptada, ST99 ácido-adaptada e não adaptada, as quais causaram muitas lesões morfológicas intestinais e sintomas de patologias severas nos animais. Esses resultados sugerem a influência da adaptação ácida na virulência da SE86, todavia o mesmo não pode ser dito para ST99, que demonstrou ser agressiva aos ratos com ou sem adaptação

ácida. STEFANOVA et al. (2007) e SASHINAMI; YAMAMOTO; NAKANE (2006) relataram que enquanto *S. Enteritidis* geralmente causa apenas enterite localizada em ratos, *S. Typhimurium* freqüentemente é responsável por doenças sistêmicas nesses animais. Tais doenças causadas pela *S. Typhimurium* em roedores assemelham-se à febre tifóide em humanos, sugerindo ser este sorovar, naturalmente mais agressivo para estes animais.

Após a exposição oral dos ratos à *Salmonella*, o trato gastrintestinal é rapidamente colonizado e este microrganismo pode ser detectado no intestino delgado e no ceco, em poucas horas. A colonização do trato gastrintestinal foi concentrada no íleo distal e no ceco e pôde ser detectada pela excreção fecal, como foi encontrado no trabalho de NAUGHTON et al. (1995). Além disso, no presente estudo, SE86 e ST99 não adaptadas foram recuperadas em maior número nas fezes do que os sorovares ácido-adaptados, o que sugere que estes últimos microrganismos não foram excretados nas fezes porque possivelmente tenham infectado e invadido mais o trato gastrintestinal dos animais. Os resultados evidenciaram também que SE86 ácido-adaptada foi recuperada em maior quantidade na junção íleo-ceco do que SE86 não adaptada e também que ST99 ácido-adaptada, corroborando com os resultados do FGS, que demonstraram haver um possível aumento na virulência de SE86 após a adaptação ácida.

Carter; Collins (1974) concluíram experimentalmente que o íleo terminal é a primeira porção intestinal invadida por *Salmonella* em modelo murino. Além disso, observaram que, após a inoculação oral de *S. Enteritidis*, esta bactéria foi encontrada quase que exclusivamente associada aos folículos das placas de Peyer do íleo e não na parede intestinal.

Hohmann; Schmidt; Rowley (1978), igualmente usaram a rota oral de infecção e também encontraram *S. Typhimurium* associada rapidamente com as placas de Peyer. As bactérias foram isoladas da associação com o tecido linfóide em 6h de infecção e o número de microrganismos que foi recuperado teve acréscimo logarítmico em dois dias, não podendo ser removidos da placa de Peyer com uma simples lavagem (JONES; GHORI; FALKOW, 1994).

Havelaar et al. (2001) demonstraram que a exposição de ratos Wistar de 6-9 semanas livres de patógenos específicos (SPF) à *S. Enteritidis* resultou em acréscimo na contagem fecal nos primeiros dias, seguido de um decréscimo transitório e subsequente acréscimo. Esses mesmos autores também demonstraram que os animais que tiveram jejum noturno e que foram expostos à suspensão bacteriana, com ácido estomacal neutralizado com bicarbonato de sódio, foram mais susceptíveis à infecção.

Naughton et al. (1995) em um estudo com *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* induzidas ao crescimento no trato gastrintestinal e responsáveis por aumentar o conteúdo de poliamina no intestino delgado dos ratos infectados mostraram que ambos os sorovares colonizaram o trato gastrintestinal dos ratos e estiveram presentes em todas as regiões do intestino após 6 dias com contagens elevadas no íleo e no ceco, porém com contagens baixas no jejuno. No mesmo estudo, ambos os sorovares foram invasivos, com número de *Salmonella* relativamente elevado nos linfonodos mesentéricos. O baço e o fígado foram também afetados e o número de bactérias nesses tecidos foi expressivamente elevado, especialmente nos ratos infectados com *S. Typhimurium*. Especificamente nas porções de 7 a 17cm do piloro e da junção íleo-ceco, as contagens foram de 3,5 logUFC.g⁻¹ e 5,6 logUFC.g⁻¹ para

S. Enteritidis e $4,2 \log\text{UFC.g}^{-1}$ e $6,5 \log\text{UFC.g}^{-1}$ para *S. Typhimurium*, respectivamente.

A microbiota intestinal normal é o maior fator de proteção dos animais e dos seres humanos contra a colonização intestinal por bactérias patogênicas (HENTGES, 1983). Desta forma, a microbiota intestinal influencia não apenas na morfologia e na fisiologia do trato gastrintestinal, mas também exerce efeitos antagônicos diretos e indiretos na colonização intestinal por microrganismos potencialmente patogênicos. Nos experimentos do presente trabalho foi observada a função do efeito barreira (ou de resistência à colonização - CR) que a microbiota intestinal desempenhou nos ratos convencionais (CV), uma vez que em camundongos gnotobióticos a proliferação bacteriana foi muito maior, em virtude da ausência desta barreira, sendo desta forma, rapidamente estabelecida a infecção. No presente estudo, as contagens nas fezes dos animais gnotobióticos, tanto no primeiro quanto no terceiro dia pós-infecção situaram-se em torno de $9,6 \log \text{UFC.g}^{-1}$, independentemente do sorovar e do tratamento dos microrganismos como ácido ou não-ácido adaptados. Resultados semelhantes foram encontrados por Hudault; Guignot; Servin (2001) que inocularam camundongos “germ-free” fêmeas com $2 \times 10^6 \text{UFC}$ de *Salmonella Typhimurium* e encontraram níveis de colonização nas fezes com uma média de $9,1 \log\text{UFC.g}^{-1}$; $9,5 \log\text{UFC.g}^{-1}$ e $9,8 \log\text{UFC.g}^{-1}$, respectivamente no 1º, 2º e 3º dia pós-infecção.

No jejuno dos camundongos gnotobióticos analisados, a média das contagens bacterianas encontradas foi $7,3 \log\text{UFC.g}^{-1}$ e no íleo-ceco de $9,1 \log\text{UFC.g}^{-1}$ com contagem média geral, nestas duas porções do trato gastrintestinal, de $8,2 \log\text{UFC.g}^{-1}$. Stecher et al. (2005), em um estudo que comparou colite causada por *S. Typhimurium* inoculada por via intragástrica na quantidade de $5,0 \times 10^7 \text{UFC}$ em

camundongos “germ-free” e em camundongos livres de patógenos específicos (SPF), pré-tratados com o antibiótico estreptomicina, encontraram níveis de colonização de 10^5 a 10^6 UFC/g de conteúdo cecal, em 4h e 8h, após a infecção, e estes níveis tiveram ligeiro decréscimo após 20h de infecção. Para os animais SPF tratados com estreptomicina e para os GF, após 8h e 20h de infecção, *S. Typhimurium* colonizou o ceco em altas densidades (10^8 a 10^9 UFC.g⁻¹), mostrando cinética de colonização similar nos dois casos. Hudault; Guignot; Servin (2001) encontraram valores de colonização intestinal no duodeno, jejuno, íleo e ceco de 3,3 logUFC.g⁻¹; 5,1 logUFC.g⁻¹; 6,6 logUFC.g⁻¹ e 9,8 logUFC.g⁻¹, respectivamente.

Sheppard et al., (2003) demonstraram que o crescimento de *Salmonella* no fígado resultou na propagação de microrganismos para novos focos de infecção e não apenas na expansão dos microrganismos inoculados. No presente estudo, neste órgão, a média geral das contagens situou-se em torno de 4,8 logUFC.g⁻¹ com exceção das contagem de ST99 ácido-adaptada, onde não foram isolados os microrganismos que foram inoculados e este microrganismo mostrou-se incapaz de produzir doença sistêmica progressiva que resultasse na morte dos animais. Resultado semelhante ao encontrado no trabalho de Nardi (1989), para uma cepa de *S. Typhimurium* denominada cepa FUNED, isolada de uma criança internada no Hospital Cícero Ferreira e sorotipificada pela FUNED (Funação Ezequiel Dias - Belo Horizonte), que igualmente não causou morte nos animais gnotobióticos testados.

A curva de mortalidade, construída apenas para os grupos de animais que apresentaram mortalidade no experimento prévio com 10 animais em cada grupo, demonstrou que os camundongos infectados com SE86 ácido-adaptada, começaram a morrer a partir 4º dia pós-infecção, apresentando também mortalidade no 5º dia e no 6º dia. Enquanto que para SE86 não adaptada, a mortalidade de

todos os animais ocorreu no 6º dia pós-infecção, sugerindo um efeito importante da glicose na possível ativação da virulência/patogenicidade da SE86. Esses resultados podem estar relacionados ao fato desse sorovar estar envolvido com grande parte das salmoneloses ocorridas no RS, nos últimos anos (OLIVEIRA et al., 2007).

Com relação ao exame histopatológico, o cólon e o ceco dos camundongos infectados com ST99, ácido-adaptadas ou não, apresentaram-se dentro dos parâmetros de normalidade. A infecção com SE86 ácido-adaptada e não adaptada levou a uma intensa ulceração, depleção de células caliciformes e necrose da mucosa do cólon. A infecção com SE86 produziu lesão intensa na mucosa do ceco, apresentando grandes áreas de necrose e infiltrado inflamatório, enquanto, a infecção com ST99 lesou apenas partes apicais da mucosa do íleo, sendo que as glândulas da parte basal permaneceram preservadas. Tanto no cólon, quanto no ceco e no íleo, a infecção com SE86 lesou de forma intensa a mucosa com áreas de ulceração, necrose e infiltrado inflamatório intenso em todos os segmentos analisados. Todas as lesões foram caracterizadas como intensas, não havendo diferença quanto à adaptação ácida ou não.

O fígado dos camundongos infectados apresentou-se com vasos congestionados, áreas de necrose e com muitos focos inflamatórios apenas para SE86 ácido-adaptada ou não adaptada. Isto demonstra que ST99 não causou grandes alterações no cólon ou no ceco, lesando apenas a parte apical da mucosa do íleo, mas mantendo as glândulas basais preservadas. No caso do fígado dos animais gnotobióticos também não foram observadas lesões causadas por ST99, apesar de a mesma, somente quando ácido-adaptada, ter sido translocada para o fígado, fato evidenciado pelas contagens bacterianas. Os resultados apontaram mais uma vez para a patogenicidade elevada de SE86 que esteve envolvida em mais de 90% dos

surtos alimentares notificados na última década no RS, comparativamente à ST99.

Havelaar et al., (2001), em seu experimento realizado com ratos Wistar SPF, não encontraram nenhuma anormalidade histopatológica no duodeno e no cólon distal dos animais infectados com *S. Enteritidis*. Na maioria dos animais infectados com *S. Enteritidis* em altas doses (8 logUFC) predominou a inflamação mononuclear nas vilosidades e no íleo. A inflamação apresentou maior gravidade no intestino grosso, especialmente no ceco com dose elevada (8 logUFC), além de ser também observado achatamento difuso do epitélio superficial do ceco, erosões locais e ulcerações. Variações na severidade das lesões nas mucosas foram observadas em doses entre 3 a 5 logUFC. Em doses abaixo de 4 logUFC, infiltração e erosão da parede cecal foi observada somente após 12 dias de infecção.

Com base nos resultados apresentados no presente trabalho, a SE86 ácido-adaptada demonstrou maior capacidade de sobrevivência no FGS e também maior virulência nos experimentos com modelos animais. Esses resultados são importantes uma vez que no RS o principal alimento veiculador de salmonelose tem sido a maionese caseira preparada com ovos crus (COSTALUNGA; TONDO, 2002; SILVEIRA; TONDO, 2006), e freqüentemente adicionada de quantidades variáveis de vinagre ou limão, o que pode proporcionar a adaptação ácida. Desta forma, é possível sugerir que tais características estão relacionadas com o freqüente envolvimento de SE86 nos surtos de salmonelose no estado do RS, na última década.

A resistência a ambientes letais, de acordo com Audia et al. (2001), como baixo pH, foi relatada na ativação de proteínas reguladoras como a RpoS. A RpoS é totalmente induzida quando as células são expostas a condições não ideais como as encontradas na fase estacionária ou em condições ácidas. A RpoS tem sido

reconhecida com um fator chave na produção de grande resistência de células em fase estacionária (GAHAN; HILL 1999), induzindo a expressão de genes de virulência/resistência. No entanto, para relacionar o possível envolvimento do gene *rpoS* ou a expressão de genes de virulência/resistência com a virulência de SE86, mais estudos se fazem necessários.

6 CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, conclui-se que:

1) SE86 ácido-adaptadas sobreviveram mais em FGS que SE86 não adaptadas, indicando um efeito de proteção das células submetidas à adaptação ácida. O mesmo efeito não foi observado na sobrevivência de ST99, uma vez que a inativação de *Salmonella* ácido foi similar em células bacterianas adaptadas e não adaptadas.

2) As contagens de SE86 e ST99 ácido-adaptadas nas fezes dos animais infectados foram menores que as contagens dos mesmos microrganismos não adaptados, indicando que a adaptação ácida aumentou a capacidade de colonizar/invadir o intestino e, conseqüentemente, a virulência destas linhagens quando adaptadas.

3) Somente SE86 provocou a morte de animais gnotobióticos testados. Além disso, SE86 ácido-adaptada demonstrou maior taxa de mortalidade do que SE86 não adaptada. Observa-se, assim maior virulência de SE86 em detrimento de ST99.

7 PERSPECTIVAS

- Estudar a expressão dos genes de virulência envolvidos na patogenicidade da SE86, especialmente do gene *rpoS*.

REFERÊNCIAS

- ARCHER, D. L. Preservation microbiology and safety: Evidence that stress enhances virulence and triggers adaptive mutations. **Trends in Food Science & Technology**. v. 7, n. 3, p. 91-95, 1996.
- ASSEVA, P. P.; IVANOV, I.; KANTARDJIEV, T. Surveillance of Human Salmonellosis in Bulgaria, 1999-2004: Trends, shifts and resistance to antimicrobial agents. **Eurosurveillance**. v.11, n.4-6, 2006.
- ASTEN, A. J. A. M. VAN; DIJK, J. E. VAN. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 44, p. 251-259, 2005.
- AUDIA, J. P.; WEBB, C. C.; FOSTER, J. W. Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 291, p. 97-106, 2001.
- BABU, U., S. et al. Differential reactive oxygen and nitrogen production and clearance of *Salmonella* serovars by chicken and mouse macrophages. **Developmental & Comparative Immunology**. v. 30, n. 10, p. 942-953, 2006.
- BACON, R. T. Thermal Inactivation of Susceptible and Multiantimicrobial-Resistant *Salmonella* Strains Grown in the Absence or Presence of Glucose. **Applied Environmental Microbiology**. v. 69, n.7, p. 4123-4128, 2003.
- BAIK, H. S. et al. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. **Microbiology**. v. 142, p. 3195-3200, 1996.
- BAIRD-PARKER, A. C. Foodborne salmonellosis. **The Lancet**. v. 336, p. 1231-1235, 1990.
- BARBER, A. E.; JONES, W. G.; MINEI, J. P., et. al. Bacterial overgrowth and intestinal atrophy in the etiology of gut barrier failure in the rat. **American Journal of Surgery**. v. 161, p. 300-304, 1991.
- BARBOSA, F. H. F. et al. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Bifidobacterium longum* Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, n. 2, 2005.
- BÄUMLER, A. J., HARGIS, B. M., TSOLIS, R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**. v. 287, p. 50-52, 2000.
- BEARSON, B. L.; WILSON, L.; FOSTER, J. W. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. **The Journal of Bacteriology**. v.180, p. 2409-2417, 1998.

BENJAMIN, M. M., DATTA, A. R. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Appliedd Environmental Microbiology**. v. 61, p. 1669–1672, 1995.

BERG, R. D. Bacterial translocation for the gastrointestinal tract. **Trends in Microbbiology**. v. 3, p. 149-154, 1995.

BERG, R. D., GARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infection and Immunity**. v. 23, p. 403, 1979.

BERG, R. D. Mechanisms confining indigenous bacteria to the gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 33, p. 2472-2484, 1980.

BERG, R. D. The indigenous gastrointestinal microflora. **Trends in Microbiology**. v. 4, p. 430-435, 1996.

BERK, P.A. et al. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, p. 859-866, 2005.

BERNDTSON, W. E. A simple, rapid and realiable method for selecting or assessing the number of replicates for animal experiments. **Journal of Animal Science**. v. 69, p. 67-76, 1991.

BEUMER, R. R.; DE VRIES, J. ROMBOUTS, F. M. *Campylobacter jejuni* non-culturable coccoid cells. **International Journal of Food Microbiology**. n.15, p. 153-163, 1992.

BEVINS, C.L.; MARTIN-PORTER, E.; GANZ, T. Defensins and innate host defence of the gastrointestinal tract. **Gut. - An International Journal of GastroIntestinal and Hepatology**. v. 45, p. 911-915, 1999.

BITAR, R; TARPLEY J. Intestinal perforation in typhoid fever: a historical and state-of-the-art review. **Review of Infectious Diseases**. v. 7, n. 2, p. 257-271, 1985.

BOHNOFFF, M.; MILLER, C. P.; MARTIN, W. R. Resistance of the mouse's intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. Factors which interfere with the initiation of infection by oral inoculation. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 120, p. 805-816, 1964.

BOUVET, P. J. M. et al. Human salmonellosis surveillance in France: recent data from the National Reference Center, p. 411-416. In: Colin, P.; Clément, G. (ed.), Proceedings of the **International Symposium Salmonella & Salmonellosis**. AFSSA/INRA/InVS/Institut Pasteur/ISPAIA, St. Brieue, France, 2002.

BUCHANAN, R.L.; EDELSON, S.G. pH-dependent stationary-phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. **Journal of Food Protection**. v. 62, p.211-218, 1999.

BRUGGENCATE, S. J. M. T. et al. Dietary Fructooligosaccharides Increase Intestinal Permeability in Rats. **Journal of Nutrition**. v. 135, p. 837-842, 2005.

CARTER, P. B.; COLLINS, F.M. The route of enteric infection in normal mice. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 139, p. 1189, 1974.

CASTILLA, K. S. **Detecção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de *Salmonella* Enteritidis utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)** 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia). Universidade de São Paulo. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia. SP: 2003.

CHALKER, R. B.; BLASER, M. J. A review of human salmonellosis. III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 9, p.111-124, 1988.

CHEVILLE, A. M. et al. *rpoS* regulation of acid, heat and salt tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**. n. 62, p. 1822– 1824, 1996.

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; CHARLES, O. T. **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 2. ed. Ames: Iowa State University, 1993. p.133-153.

COHEN, M. L.; R. V. TAUXE. Drug-resistant *Salmonella* in the United States: an epidemiologic perspective. **Science**. v. 234, p. 964-969, 1986.

COLLINS, F. M. **Bacteriological Reviews**. v. 38, p. 371-402, 1974.

COOPER, G. C.; ROWBURY, R. J. Virulence plasmid-associated sensitivity to acid in *Escherichia coli* and its possible significance in human infections. **Journal of Medical Microbiology**. v. 22, p. 231-236, 1986.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p. 01-05, 2002.

CRUCHAGA, S. et al. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 47, 315-321, 2001.

D'AOUST, J. Y. Infective dose of *Salmonella typhimurium* in Cheddar cheese. **Americal Journal of Epidemiology**. v.122, p. 717. 1985.

D'AOUST J. Y. *Salmonella* and international trade. **International Journal of Food Microbiology**. v. 24, n. 4, p. 11-31, 1994.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. Molecular Basis of the Interactions of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Microbiology Reviews**. v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.

DAVIS, M. J.; COOTE, P. J.; O'BYRNE, C. P. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptative acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. **Microbiology**. v.142, p. 2975-2982, 1996.

DODD, C. E. R.; ALDSWORTH, T. G. The importance of RpoS in the survival of bacteria through food processing. **International Journal of Food Microbiology**. v. 74, p. 189-194, 2002.

DODD, C. E. R. et al. Inimical processes: Bacterial self-destruction and sub-lethal injury. **Trends in Food Science & Technology**. v. 8, n. 7, p. 238-241, 1997.

DODD, C. E. R.; RICHARDS, P. J.; ALDSWORTH, T. G. Suicide through stress: A bacterial response to sub-lethal injury in the food environment. **International Journal of Food Microbiology**. v.120, n. 30, p. 46-50, 2007.

DUFRENE, J. et al. Quantification of the contamination of chicken and chicken products in the Netherlands with *Salmonella* and *Campylobacter*. **Journal of Food Protection**. v. 64, p. 538-541, 2001.

EL-GAZZAR F. E.; MARTH, E. H.. Salmonellae, Salmonellosis, and Dairy Foods: A Review. **Journal of Dairy Science**. v. 75, p. 2327-2343, 1992.

FARHADI, A. Intestinal barrier: An interface between health and disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. v. 18, p. 479-497, 2003.

FERNANDES, S. A. Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 45, n. 02, p. 59-63, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION – FDA. **Bacteriological Analytical Manual**. 7. ed. Arlington: Aoac International, 1992.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FOSTER, J. W. Microbial responses to acid stress. In: STORZ, G.; HENGGE-ARONIS, R. (Org). **Bacterial stress responses**. Washington: American Society for Microbiology: 2000. p. 99-115.

FOSTER, J. W.; HALL, H. K. Adaptative acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**. v. 172, p. 771-778, 1990.

FOSTER, J. F.; OLIVER M. G.; SYLVESTER F. A. Production, structure, and biologic relevance of gastrointestinal mucins. In: **Infections of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1995. p. 71-88.

FRANCO; B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia Alimentar**. São Paulo: Ateneu, 1996.

FULLER, R.; JAYNE-WILLIAMS, D. J. Resistance of the fowl (*Gallus domesticus*) to invasion by its intestinal flora. II. Clearance of translocated intestinal bacteria. **Research in Veterinary Science**. v.2, p. 368, 1970.

GAHAN, C.G.M; HILL, C. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 50, p. 93–100, 1999.

GAHAN, C. G. M.; O'DRISCOLL, B.; HILL, C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acid foods and during milk fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 62, p. 3128-3132, 1996.

GEIMBA, M. P. et al. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**. v. 67, n. 6, p.1229-1233, 2004.

GORDON, H. A.; PESTI, L. The gnotobiotic animal as a tool in the study of host microbial relationships. **Bacteriological Reviews**. v. 35, p. 390-429, 1971.

GOODSON, M.; ROWBURY, R. J. Habituation to normal lethal acidity by prior growth of *Escherichia coli* at a sub-lethal acid pH value. **Letters in Applied Microbiology**. v. 8, p. 77-79, 1989.

HAPFELMEIER, S.; HARDT, W-D. A mouse model dose for *S. typhimurium* induced enterocolitis. **Trend in Microbiology**. v. 13, n. 10, p. 497-503, 2005.

HAVELAAR, A. H. et al. A rat model for dose-response relationships of *Salmonella* Enteritidis infection. **Journal of Applied Microbiology**. v. 91, p. 442-452, 2001.

HENTGES, D. J., Enteric Pathogen-Normal Flora Interactions. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 23, p. 1451-1456, 1970.

HENTGES G. Role of the intestinal microflora in host defense against infection. In: HENTGES, D. (Org.). **Human intestinal microflora in health and disease**. New York: Academic Press, 1983. p. 311-331.

HILDEBRAND, G. J., WOLOCHOW, H. Translocation of bacteriophage across the intestinal wall of the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 109, p. 183, 1962.

HIRSH, D. C. In: *Salmonella*. BIBERTEIN, E. L.; ZEE, Y. C. (Org.), **Review of Veterinary Microbiology**. Orlando: Blackwell, 1990. p. 110-115.

HOHMANN A, SCHMIDT G, ROWLEY D. Intestinal colonization and virulence of *Salmonella* in mice. **Infection and Immunity**. v. 22, p. 763-770, 1978.

HOLT, J. G. et al. Facultative anaerobic Gram-negative rods. In: **BERGEY'S manual of determinate bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994, p. 186-187.

HUDAULT, S.; GUIGNOT, J.; SERVIN, A. L. *Escherichia coli* strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against *Salmonella typhimurium* infection. **Gut - An International Journal of Gastrointestinal and Hepatology**. v. 49, p. 47-55, 2001.

JAY, J. **Modern Food Microbiology**. 5. ed. New York: Chapman & Hall, 2000.

JOHNSON, L. R. Secreção gástrica. In: JOHNSON, L. R (Org.). **Gastrointestinal Fisiology**. 6. ed., St. Louis: Mosby, 2001. p. 75-94.

JONES, B. D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* Initiates Murine Infection by Penetrating and Destroying the Specialized Epithelial M Cells of the Peyer's Patches. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 180, p. 15-23, 1994.

KANGAS, S. et al. Costs of two alternative *Salmonella* control policies in Finnish broiler production. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 49, n. 35, 2007.

KOO, J., MARSHALL, D.L., DEPAOLA, A. Antacid increases survival of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio vulnificus* phage in a gastrointestinal model. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, p. 2895-2902, 2001.

LALMANACH A. C; LANTIER F. Host cytokine response and resistance to *Salmonella* infection. **Microbes and Infections**. v.1, p. 719-726, 1999.

LEE, L. A. et al. Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in United States, 1989–1990. **Journal of Infectious Diseases**. v.170, p. 128–134, 1994.

LEE, V. T.; SCHNEEWIND, O. **Immunological Reviews**. v. 168, p. 241-255, 1999.

LEE, I.; SLONCZEWSKI, J. L.; FOSTER, J. M. A low pH inducible stationary-phase sigma factor δ (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**. v. 18, p. 636-643, 1994.

LEMNOR M.; POPOFF, M. Y. Designation of *Salmonella enterica* nov. as type and only species of genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 37, p. 465-468, 1987.

LEYER, G. J.; JOHNSON, E. A. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**. v, 58, p.2075-2080, 1992.

LEYER, G. J.; WANG, L. L; JOHNSON, E. A. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acid foods. **Applied and Environmental Microbiology**. v, 61, p. 3752-3755, 1995.

LIN, J. et al. Comparative analyses of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* and *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v.177, p. 4097-4104, 1995.

LOU, Y.; YOUSEF, A. E. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 63, p. 1252-1255, 1997.

MACHADO, T. L. 2007. **Avaliação da aderência de três sorovares de *Salmonella* ao aço inoxidável e ao polietileno e da capacidade de desinfecção dessas superfícies**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. RS: 2007.

MacFADDIN, J. F. **Biochemical tests for identifications of medical bacteria**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MAGALHÃES, J. G.; TATTOLI, I.; GIRARDIN, S. E. The intestinal epithelial barrier: How to distinguish between the microbial flora and pathogens. **Seminars in Immunology**. v. 19, p. 106–115, 2007.

MALHEIROS, P. S. et al. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. **Journal of Food Safety**. 2008, *in press*.

MALHEIROS, P. S.; DE PAULA, C. M. D.; TONDO, E. C. Avaliação da cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com outros sorovares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 27, n.4, p. 751-755, 2007.

MASTROENI; P. SHEPPARD, M. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. **Microbes and Infection**. v. 6, p. 398-405, 2004.

McCRACKEN, V. J.; LORENZ, R. G. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. **Cellular Microbiology**. v. 3, p.1–11, 2001.

McFARLAND, L.V. Normal flora: diversity and functions. **Microbial Ecology in Health and Diseases**. v. 12, p. 193-207, 2000.

McGHEE, J.R., LAMM, M.E., STROBER, W. Mucosal immune responses: an overview. In: OGRA, P.L. (Org.). **Mucosal Immunology**. San Diego: Academic Press, p. 485-506, 1999.

MILLER; C. P.; BOHNHOFF, M. A study of experimental *Salmonella* infection in mouse. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 111, p. 107, 1962.

MONACK, D. M. et al. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 192, p. 249-258, 2000.

MOTA, C. C. et al. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis. Relato de um surto ocorrido em Curitiba - PR. **Higiene Alimentar**. v. 2, n. 3, p. 123-126, 1983.

MURESU, E. et al. Clonal relations among *Salmonella* Enteritidis phage type 3 outbreak isolates traced by DNA fingerprinting. **Microbiologica**. v. 24, p. 371-377, 2001.

NADVORNY, Y. A. et al. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no RS em 2000. **Acta Scientiae Veterinae**. v. 32, n.1, p. 47-51, 2004.

NARDI, R. M. D. **Salmonelose em camundongos CWF isentos de germes**. 1989. Dissertação (Mestrado em Microbiologia). Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. MG: 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for de Care and Use of Laboratory Animals**. Washington: National Academic Press, 1996.

NAUGHTON, P. J. et al. *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* induce gut growth and increase the polyamine content of the rat small intestine in vivo. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 12, p. 251-258, 1995.

NICOLI, J.R. Normal gastrointestinal microbiota in domestic animals and human beings. **Enferm Infectious and Microbiology Clinics**. v. 15, p. 183-190, 1995.

NYACHUBA, D., DONNELLY, C. Sub-lethal injury, pathogen virulence and adaptation. In: GRIFFITHS, M. (Org.). **Understanding Pathogen Behaviour**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltda, 2005. p. 152–198.

O'BRIEN, A D.; SCHER, I.; FORMAL, S. B. Effect of silica on the innate resistance of inbred mice to *Salmonella typhimurium* infection. **Infection and Immunity**. v. 25, n.2, p.513-520, 1979.

O'BRIEN S. J., VALK H. de, *Salmonella* – “old” organism, continued challenges! **EuroSurveillance**. v. 8, p. 29–31, 2003.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: A Model for Bacterial Pathogenesis. **Annual Reviews of Medicine** v. 52. p. 259-74, 2001.

OLIVEIRA, F. A. DE; et al. Use of PCR-Ribotyping, RAPD, and Antimicrobial Resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**. v. 1, n. 2, 170-176, 2007.

O'NEIL, D. A. et al. Expression and regulation of the human b-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. **The Journal of Immunology**. v. 163, p. 6718-6724, 1999.

PERESI, J. T. M., et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**. v. 32, n. 5, 1998.

PLEASANTS, J. R. Gnotobiotics. In: MELBY, E. C., Jr.; ALTMANN, N. H. (Org.). **Handbook of Laboratory Animal Science**. Cleveland: CRC Press, 1974. p. 119-174.

REEVES, M. W. et al. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 27, p. 313-320, 1989.

ROWBURY, R. J.; GOODSON, M. Glucose induced acid tolerance appearing at neutral pH in log-phase *Escherichia coli* and its reversal by cyclic AMP. **Journal of Applied Microbiology**. v. 85, p. 615-620, 1998.

ROWBURY, R. J. Regulatory components, including integration host factor CysB and H-NS, that virulence pH responses in *Escherichia coli*. **Letters Applied in Microbiology**. v. 22, p. 57-61, 1997.

RYCHLIK, I.; BARROW, P. A. *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonization and infection. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 29, n.5, p. 1021-1040, 2005.

RYU, J.H.; BEAUCHAT, L. R. Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to acidic environments. **Food Microbiology**. v. 16, p. 317-324, 1999.

SAFATLE, A de M. V. et al. Implante de duas membranas biológicas em microbolsa corneana como modelo experimental de angiogênese. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 39, n. 4, p. 189-195, 2002.

SAMELIS, J.; IKEDA, J. S.; SOFOS, J. N. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Applied Microbiology**. v 95, p. 563-575, 2003.

SASHINAMI, H.; YAMAMOTO, T.; NAKANE, A. The cytokine in the maintenance of a persistent infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in mice. **Cytokine**. v. 33, p. 212-218, 2006.

SAVAGE, D. C., Factors Influencing Biocontrol of Bacterial Pathogens in the Intestine. **Food Technology**. v.7, p. 82-86, 1987.

SHELOBINA, E. S. et al. 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. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 2959-2965, 2004.

SHEPPARD, M. et al. Dynamics of bacterial growth and distribution within the liver during *Salmonella* Infection. **Cellular Microbiology**. v. 5, n. 9, 2003.

- SILVEIRA, J. B.; TONDO, E.C.. Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001. In: COLIN, P.; CLÉMENT, G. (Org.). **International Symposium Salmonella and Salmonellosis. Epidemiology and Public Health**. Ploufragan: Zoopole Developpment, 2006. p. 521-522.
- SONNENBURG, J.L.; ANGENENT, L.T.; GORDON, J.I. Getting a grip on things: how do communities of bacterial symbionts become established in our intestine? **Nature Immunology**. v. 5, p. 569-573, 2004.
- SOPENA, L. C. et al. Survival of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* in frozen chicken hamburger. **Journal of Muscle Foods**. 2008, *in press*.
- SMITH, J. L. The role of gastric acid in preventing foodborne disease and how bacteria overcome acid conditions. **Journal of Food Protection**. v. 66, p. 1292 - 1303, 2003.
- SMITH, K.; MCCOY, C. D.; MACPHERSON, A. J. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. **Seminars in Immunology**. v. 19, p. 59–69, 2007.
- STECHER et al. Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Colitis in Germfree Mice and Mice Pretreated with Streptomycin. **Infection and Immunity**. v. 73, n.6, p. 3228-3241, 2005.
- STEFANOVA, T. et al. Enhanced resistance to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice after coumarin treatment. **Microbes and Infection**. v. 9. p. 7-14, 2007.
- SUZUKI, K.; et al. Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. **Seminars in Immunology**. v. 19, p. 127-135, 2007.
- TAKEUCHI, A. Penetration off the intestinal epithelium by various microorganisms. **Current Topics in Pathology**. v. 54, p.1, 1971.
- TAMPLIN, M. I. Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 in simulated human gastric fluid. **Journal of Environmental Applied Microbiology**. v. 71, p. 320-325, 2005.
- TANNOCK, G. W. **Medical Importance of the Normal Microflora**. Great Britain: Kluwer Academic Publishers, 1999. p. 235-237.
- TANNOCK, G. W. Normal Microflora: **An Introduction to microbes inhabiting the human body**. Londres: Chapman and Hall, 1995.
- TASSIOS, P.T. et al. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* during a 7-years period in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 35, p. 1316-1321, 1997.

- THONG, K. L. et al. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* pulsed field gel electrophoresis and ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 33, p. 1070–1074, 1995.
- TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.
- VARNAM, A. H. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. Ayelesbury: Wolfe, 1991. p. 51-462.
- VAN DER WAAIJ, D. Colonization resistance of the digestive tract: Mechanism and clinical consequences. **Die Nahrung**. p. 507-515, 1987.
- VAN DER WAAIJ, D.; BERGHUIS-DE VRIES, J. M.; LEKKERKERK-VAN DER WEES, J. E. C. Colonization resistance of the digestive tract and spread of bacteria to the lymphatic organs in mice. **The Journal of Hygiene**. v. 70, p. 42, 1971a.
- VAN DER WAAIJ, D., BERGHUIS-DE VRIES, J. M.; LEKKERKERK-VAN DER WESS, J. E. C. Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic treated mice. **The Journal of Hygiene**. v. 69, p. 605-610, 1971b.
- VAN DER WAAIJ, D.; VRIES-HOSPERS, WELLING, G. W., The influence of antibiotics on gut colonization. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.18. p. 155-158, 1986.
- VAUGHAN, E. E. et al. A molecular view of the intestinal ecosystem. **Current Issues Intestinal Microbiology**. v. 1, p. 1-12, 2000.
- VOLLAARD, E. J., CLASENER, H. A. L. Colonization Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 38, p. 409-414. 1994.
- WILCOCK, B. P.; SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: LEMAN, A. D. et al. (Org.) **Diseases of swine**. 7. ed. Ames: Iowa University Press, 1993. p. 570-583.
- WILDE S. et al Growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 in media containing glucose results in enhanced RpoS-independent heat and acid tolerance but does not affect the ability to survive air-drying on surfaces. **Food Microbiology**. v. 17, p. 679-686, 2000.
- WOSTMANN, B. S. **Germfree and Gnotobiotic Animal Models: Background and Applications**. Boca Raton, FL: CRC Press , 1996.
- YUK, H.G.; SCHNEIDER, K.R. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerator and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. **Food Microbiology**. v. 23, p. 694-700, 2006.
- ZHANG, S. et al. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. **Infection and Immunity**. v. 71, n. 1, p. 1–12, 2003.

ANEXO A - MEIOS DE CULTURA, DILUENTES E SOLUÇÕES UTILIZADAS

1. Ágar Infusão Cérebro e Coração (BHI)

Composição (g/L)	
Infusão de cérebro	200,0 g
Infusão de coração	250,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Dextrose	2,0 g
Ágar-Ágar	15,0 g

Preparo:

Dissolver 52 g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deve ser 7,4 ± 0,2.

2. Caldo Infusão Cérebro e Coração (BHI)

Composição (g/L)	
Infusão de cérebro	200,0 g
Infusão de coração	250,0 g
Proteose peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Dextrose	2,0 g

Preparo:

Dissolver 37 g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deve ser 7,4 ± 0,2.

3. Água Peptonada Tamponada 1,0%

Composição (g/L)	
Peptona	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	3,5 g
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	1,5 g

Preparo:

Dissolver 10 g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. O pH final deste diluente deve ser 7,2 ± 0,2.

4. Caldo Rapport Vassiliadis

Composição (g/L)

Triptona	4,5 g
Cloreto de Magnésio (MgCl ₂ ·6H ₂ O)	29,0 g
Cloreto de sódio	8,0 g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	0,6 g
Fosfato dopotássico (K ₂ HPO ₄)	0,4 g
Verde malaquita	0,036 g

Preparo:

Dissolver 43 g do meio em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. O pH final deste meio deve ser 5,2 ± 0,2.

5. Ágar Verde Brillante (AVG)

Composição (g/L)

Proteose peptona	10,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Lactose	10,0 g
Sacarose	10,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Verde brilhante	0,0125 g
Vermelho de fenol	0,08 g
Ágar-Ágar	20,0 g

Preparo:

Dissolver 58 g do meio em 1L de água destilada e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. Distribuir em placas de Petri estéreis e deixar solidificar. O pH final deste meio deve ser de 6,9 ± 0,2.

6. Ágar Três Açúcares e Ferro (TSI)

Composição (g/L)

Peptona de caseína	15,0 g
Peptona de carne	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Lactose	10,0 g
Sacarose	10,0 g
Dextrose	1,0 g
Sulfato ferroso	0,2 g
Tiosulfato de sódio	0,5 g
Vermelho de fenol	0,024 g
Ágar-Ágar	12,0 g

Preparo:

Dissolver 65 g do meio em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. Retirar da autoclave e inclinar os tubos até esfriar e solidificar o meio. O pH final deste meio deve ser de 7,4 ± 0,2.

7. Ágar Lisina Ferro (LIA)

Composição (g/L)

Peptona de carne	10,0 g
Extrato de levedura	3,0 g
Dextrose	10,0 g
Tiosulfato de sódio	10,0 g
Citrato férrico amoniacal	5,0 g
Púrpura de bromocresol	0,0125 g
Cloridrato de L-lisina	0,08 g
Ágar-Ágar	20,0 g

Preparo:

Dissolver 32 g do ágar em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. Retirar da autoclave e inclinar os tubos até esfriar e solidificar o meio. O pH final deste meio deve ser de $6,7 \pm 0,2$.

8. Ágar Citrato

Composição (g/L)

Fosfato de sódio amoniacal (NaNH_3PO_4)	1,5 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	1,0 g
Sulfato de Magnésio	0,2 g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	3,0 g

Preparo:

Dissolver os componentes em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min. O pH final deste meio deve ser de $6,7 \pm 0,2$.

9. Ágar Uréia de Christensen

Composição (g/L)

Peptona de carne	0,1 g
Glicose	0,1 g
Cloreto de sódio	0,5 g
Fosfato dissódico (Na_2HPO_4)	0,12 g
Fosfato monopotássico (KH_2PO_4)	0,08 g
Vermelho de fenol	0,0012 g
Ágar-Ágar	1,5 g

Preparo:

Preparar uma solução de uréia à 40 % e deixar a 65 °C por duas horas. Autoclavar o meio, sem a uréia à 121°C por 15 minutos, esperar o meio atingir uma temperatura em torno de 50 °C e então adicionar 5ml da solução de uréia à 40 %. Distribuir em tubos e inclinar.

10. Soluções para coloração de Gram

Cristal Violeta

Composição (g/L)

Cristal violeta	0,4 g
Etanol 95%	10,0 g
Fenol	1,0 g
Água Destilada	100,0 mL

Preparo:

Diluir o cristal violeta em etanol 95% e adicionar o fenol dissolvido em água destilada. Manter em repouso por 24 h e filtrar.

Fucsina

Composição (g/L)

Fucsina básica	0,3 g
Etanol 95%	10,0 g
Fenol	5,0 g
Água Destilada	95,0 mL

Preparo:

Diluir a fucsina em etanol 95% e adicionar o fenol dissolvido em água destilada. Diluir a solução em 1/10.

Lugol

Composição (g/L)

Iodo	5,0 g
Iodeto de potássio	10,0 g

Preparo:

Misturar os dois reagentes e adicionar 100 mL de água destilada. Diluir 1/15.

Álcool-Acetona

Composição (g/L)

Acetona	50,0 mL
Iodeto de potássio	50,0 mL

Preparo:

Misturar os dois reagentes.

11. Solução Salina 0,85%

Composição (g/L)

Cloreto de sódio (NaCl)	8,5 mL
Água destilada	1000,0 mL

Preparo:

Dissolver o NaCl em água destilada, esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min.

12. Solução Salina Tamponada e Suplementada

Composição (g/L)

Cloreto de sódio (NaCl)	5,0 g
Fosfato de potássio dibásico anidro (K ₂ HPO ₄)	1,00 g
Peptona	2,0 g
Extrato de levedura	2,0 g
L-cisteína	0,5 g
Água destilada	1000,0 mL

Preparo:

Dissolver os componentes em 1L de água destilada, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar em autoclave a 121° C por 15 min.