UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE *SALMONELLA* PERTENCENTES A DIFERENTES SOROVARES ISOLADAS DE MATRIZES E DE FRANGOS DE CORTE NO CAMPO, DE CARCAÇAS DE FRANGO E DE ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM SURTOS DE SALMONELOSE.

Tese de Doutorado

Karen Apellanis Borges

PORTO ALEGRE
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE *SALMONELLA* PERTENCENTES A DIFERENTES SOROVARES ISOLADAS DE MATRIZES E DE FRANGOS DE CORTE NO CAMPO, DE CARCAÇAS DE FRANGO E DE ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM SURTOS DE SALMONELOSE.

Autora: Karen Apellanis Borges

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciências Veterinárias na área de Medicina Veterinária Preventiva, especialidade de Sanidade Avícola.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento

PORTO ALEGRE
2016

CIP - Catalogação na Publicação

Borges, Karen Apellanis
Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de Salmonella pertencentes a diferentes sorovares isoladas de matrizes e de frangos de corte no campo, de carcaças de frango e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose / Karen Apellanis Borges. -- 2016.
133 f.

Orientador: Vladimir Pinheiro do Nascimento.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Salmonella. 2. sanidade avícola. 3. saúde pública. I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, orient. II. Título.

Karen Apellanis Borges

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CEPAS DE *SALMONELLA* PERTENCENTES A DIFERENTES SOROVARES ISOLADAS DE MATRIZES E DE FRANGOS DE CORTE NO CAMPO, DE CARCAÇAS DE FRANGO E DE ALIMENTOS ENVOLVIDOS EM SURTOS DE SALMONELOSE.

Aprovada em 17 MAR 2016.

APROVADO POR:

_____

Prof. Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento
Orientador e Presidente da Comissão

_____

Prof. Dr. Hamilton Luiz de Souza Moraes
Membro da Comissão

_____

Prof. Dra. Laura Beatriz Rodrigues
Membro da Comissão

_____

Prof. Dra. Maristela Lovato
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter colocado em minha vida todos os que estão nestes agradecimentos, sem os quais eu não teria chegado até aqui.

Agradeço especialmente aos meus pais, Roberto e Tania, que além de sempre incentivarem os meus estudos, me transmitiram seus valores e me ensinaram, com muito amor e carinho, que a família é a base de tudo. Também agradeço a minha irmã Michelle, que sempre foi uma ótima conselheira e uma grande amiga. Agradeço também a Kika, minha companheirinha canina, que me deixou alguns meses antes de eu terminar esta tese.

Agradeço imensamente ao meu marido e ao melhor colega de trabalho que eu poderia ter. Thales, muito obrigada por todo amor, carinho e apoio durante os mais de quatro anos de realização deste doutorado. Muito obrigada pelos conselhos, pelas ideias, pelas críticas e pela ajuda nos experimentos. Sem as tuas palavras e o teu amor, a caminhada até aqui teria sido muito mais difícil.

Agradeço aos professores Hamilton Luiz de Souza Moraes e Carlos Tadeu Pippi Salle pelos constantes ensinamentos e pelo incentivo na realização deste doutorado. Agradeço aos colegas e aos estagiários do CDPA, que de alguma maneira me ajudaram para a conclusão de mais esta etapa. Agradeço especialmente a Sara, que participou de todas as etapas do meu doutorado e que se tornou uma grande amiga.

Agradeço ao meu orientador, professor Vladimir Pinheiro do Nascimento, pela oportunidade oferecida para que eu realizasse o mestrado e o doutorado na UFRGS, e pela total confiança para o desenvolvimento deste projeto.

Por fim, agradeço imensamente a UFRGS e a Faculdade de Veterinária pela excelente formação profissional proporcionada desde a graduação até a realização deste doutorado.

RESUMO

A expansão da avicultura resultou em um aumento no número de aves alojadas e na concentração de unidades de produção, assim facilitando a disseminação de doenças, especialmente aquelas transmitidas pelo consumo dos produtos avícolas. *Salmonella* spp. continua sendo um dos principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, inclusive no Brasil. O objetivo deste trabalho foi a caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Salmonella* spp. pertencentes a diferentes sorovares e isoladas de matrizes e de frangos de corte no campo, de carcaças de frango e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose. Foi realizada a avaliação da capacidade de produção de biofilme em placas de poliestireno submetidas a temperaturas de incubação de 37ºC, 28ºC, 12ºC e 3ºC, a fim de simular as variações de temperatura que os produtos de origem animal sofrem do campo até a residência do consumidor. Também foi realizada a avaliação da resistência antimicrobiana através da técnica de disco-difusão em ágar frente a dez antimicrobianos. Cepas multirresistentes foram caracterizadas genotipicamente para genes de resistência antimicrobiana. Para a caracterização molecular foi realizada a pesquisa de 27 genes associados à virulência através de PCR. Também foi feita a determinação do fagotipo PT4 e a ribotipificação de cepas de *S.* Enteritidis através de PCR. Entre as cepas analisadas, 71,6% produziram biofilme, mas a maioria de forma fraca. As cepas apresentaram comportamentos distintos nas diferentes temperaturas de incubação, demonstrando que há forte influência da temperatura na produção de biofilme. A produção destas estruturas não está associada à origem de isolamento da cepa, mas está parcialmente associada aos sorovares. As maiores resistências antimicrobianas, independentemente do sorovar e da origem de isolamento da cepa, foram para sulfafurazol, ciprofloxacina, enrofloxacina e tetraciclina. Observou-se que a resistência a alguns antimicrobianos está associada ao sorovar e à fonte de isolamento da cepa. Aproximadamente 14% das cepas foram classificadas como multirresistentes, sendo a maioria de origem avícola. Apenas dois genes de resistência (*bla*$_{PSE}$ e *floR*) não foram detectados. A maioria dos genes de virulência (*invA, hilA, lpfA, lpfC, agfA, avrA, sivH, orgA, prgH, spaN, tolC, sipB, sitC, pagC, msgA, spiA, sopB, sifA, sseL, stn*) apresentou frequência superior a 90%. Oito genes (*sefA, lpfA, lpfC, spvB, spvC, pefA, sopE* e *iroN*) estão associados com o sorovar, oito (*spvB, spiA, pagC, sipB, prgH, spaN, sitC* e *lpfC*) estão associados com as fontes avícolas e um gene (*iroN*) está associado às cepas de origem humana. Não se observou relação entre produção de biofilme e resistência antimicrobiana e entre os genes de virulência e a produção de biofilme. Entre as cepas analisadas, 94,7% foram classificadas como *S.* Enteritidis PT4. A análise das cepas circulantes entre humanos e animais através da ribotipificação por PCR indica que um mesmo clone de *S.* Enteritidis é responsável por surtos de salmonelose e está disseminado nos diferentes elos da produção avícola. O sequenciamento de DNA confirmou a similaridade genética observada na ribotipificação. Estes resultados ressaltam a importância do controle de *Salmonella* spp. e do monitoramento em toda produção animal e em saúde pública.

Palavras-chave: biofilme, suscetibilidade antimicrobiana, genes de virulência, PCR-ribotipificação, clones.

ABSTRACT

The poultry industry has been characterized by an increase in the number of housed animals in recent years, concentrating the production and facilitating the spread of many diseases. Among all illness transmitted by food, salmonellosis is of particular importance. The aim of this work was to characterize, by phenotypic and molecular typing methods, strains of Salmonella spp. belonging to different serovars and isolated from breeders and broilers in the field, poultry carcasses and foods involved in salmonellosis outbreaks. Biofilm production in polystyrene microtiter-plates was evaluated at 37ºC, 28ºC, 12ºC and 3ºC, in order to simulate the temperature changes that animal products suffer from the field to the consumer's residence. Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disk diffusion method to ten antimicrobial agents. The molecular characterization of multidrug-resistant strains was performed by PCR to resistance genes. Individual and multiplex PCR were conducted for the detection of 27 virulence-associated genes and for the detection of S. *Enteritidis PT4 strains. PCR-ribotyping was performed to determine the clonal relationship among S. Enteritidis strains. 71.6% of total strains were biofilm producers, but the majority was weak producer. The strains had different behaviors in different incubation temperatures, demonstrating that there is a strong influence of temperature on biofilm production. The production of these structures is not associated with source of isolation, but is partially associated with serovars. The greatest antimicrobial resistances, regardless of the serovar and the isolation source, were to sulfafurazol, ciprofloxacin, enrofloxacin and tetracycline. It was observed that resistance to some antibiotics is associated with the serovar and with the isolation source. Approximately 14% of the strains were multidrug-resistant, most of them from poultry origin. Only two resistance genes (bla$_{PSE}$ and floR) were not detected. 20 genes (invA, hilA, lpfA, lpfC, agfA, avrA, sivH, orgA, prgH, spaN, tolC, sipB, sitC, pagC, msgA, spiA, sopB, sifA, sseL, stn) had a frequency higher than 90%. Eight (sefA, lpfA, lpfC, spvB, spvC, pefA, sopE and iroN) are associated with serovar, eight (spvB, spiA, pagC, sipB, prgH, spaN, sitC and lpfC) with poultry sources and only one gene (iroN) is associated with strains from outbreaks. There is no relation between biofilm production and antimicrobial resistance, neither between virulence genes and biofilm production. 94.7% of the evaluated strains were classified as S. Enteritidis PT4. The ribotyping analysis of circulating strains among humans and animals indicates that one clone of S. Enteritidis is responsible for salmonellosis outbreaks and it is circulating in the poultry production chain. DNA sequencing confirmed the genetic similarity observed in PCR-ribotyping. These results emphasize the importance of monitoring and control of Salmonella in all animal production chains and in the public health system.*

Key-words: biofilm, antimicrobial susceptibility, virulence genes, PCR-ribotyping, clonal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Determinação do fagotipo PT4 em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica de PCR..... 81

Figura 2 - Ribotipificação por PCR das cepas de *Salmonella* Enteritidis: ribotipos R2 e R4..... 86

Figura 3 - Árvore filogenética demonstrando a relação entre as sequências nucleotídicas das cepas de *Salmonella* Enteritidis classificadas nos ribotipos R2 e R4..... 87

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Comportamento das 13 cepas de *Salmonella* spp. classificadas como fortemente produtoras de biofilmes a 37ºC quando incubadas a 28ºC, 12ºC e 3ºC..... 47

Gráfico 2 - Comportamento das 69 cepas de *Salmonella* spp. classificadas como não produtoras de biofilmes a 37ºC quando incubadas a 28ºC, 12ºC e 3ºC..... 47

Gráfico 3 - Suscetibilidade antimicrobiana das 243 cepas de *Salmonella* spp. frente aos dez antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar com classificação em três categorias (suscetível, intermediário e resistente)..... 53

Gráfico 4 - Suscetibilidade antimicrobiana das 243 cepas de *Salmonella* spp. frente aos dez antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar com classificação em duas categorias (suscetível e resistente)..... 54

Gráfico 5 - Frequência relativa (%) de cepas resistentes aos antimicrobianos testados conforme o sorovar: *S.* Enteritidis (n=150), *S.* Heidelberg (n=49), *S.* Typhimurium (n=8) e *S.* Hadar (n=14)..... 58

Gráfico 6 - Frequência absoluta de cepas resistentes aos antimicrobianos testados conforme o sorovar: *S.* Agona (n=4), *S.* Anatum (n=5), *S.* Bredeney (n=5), *S.* Infantis (n=2), *S.* Tennessee (n=3), *S.* Brandenburg (n=2) e *S.* Schwarzengrund (n=1)..... 60

Gráfico 7 - Frequência relativa (%) de cepas de *Salmonella* Enteritidis resistentes aos antimicrobianos testados isoladas de fontes avícolas e de surtos..... 61

Gráfico 8 - Frequência relativa (%) de cepas classificadas como multirresistentes (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos) conforme o sorovar..... 63

Gráfico 9 - Árvore de classificação das cepas de *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Heidelberg e *S.* Hadar com base nos genes de virulência *sefA*, *sopE* e *lpfA*..... 76

Gráfico 10 - Árvore de classificação das cepas de *S.* Enteritidis isoladas de fontes avícolas e de surtos com base nos genes de virulência *spaN* e *iroN*..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Cepas de *Salmonella* spp. selecionadas para o estudo e agrupadas conforme a classificação por sorovar..... 35

Tabela 2 - Origem das cepas: fonte de isolamento e número de cepas analisadas em cada grupo..... 36

Tabela 3 - Classificação das 243 cepas de *Salmonella* spp. de diferentes sorovares conforme a capacidade de produção de biofilme a 37ºC..... 41

Tabela 4 - Comparação dos sorovares aos pares conforme a capacidade de produção de biofilme a 37ºC..... 42

Tabela 5 - Classificação das 150 cepas de *S.* Enteritidis, considerando-se três origens de isolamento (campo, produto e surtos) conforme a capacidade de produção de biofilme a 37ºC 45

Tabela 6 - Classificação das 150 cepas de *S.* Enteritidis, considerando-se duas origens de isolamento (fontes avícolas e surtos) conforme a capacidade de produção de biofilme a 37ºC 45

Tabela 7 - Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana através da técnica de PCR: sequência dos *primers*, tamanho do amplicon e cepa selecionada como controle positivo para cada protocolo..... 51

Tabela 8 - Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana através da técnica de PCR: concentrações dos reagentes do *mix*, condições e número de ciclos do termociclador..... 52

Tabela 9 - Associação entre a resistência a um determinado antimicrobiano e os sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Hadar, *S.* Heidelberg e *S.* Typhimurium..... 58

Tabela 10 - Distribuição dos 27 genes de virulência detectados através de PCR nas 243 cepas de *Salmonella* spp. independentemente da origem e do sorovar..... 69

Tabela 11 - Frequências absoluta e relativa (%) da presença dos 27 genes de virulência pesquisados conforme os sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Heidelberg, *S.* Hadar e *S.* Typhimurium..... 74

Tabela 12 - Frequências absoluta e relativa (%) da presença dos 27 genes de virulência pesquisados conforme a origem de isolamento das cepas de *S.* Enteritidis..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	*American Type Culture Collection* (Coleção Americana de Tipos de Cultura)
BHA	*Brain-Heart Agar* (ágar cérebro-coração)
BHI	*Brain-Heart Infusion* (caldo cérebro-coração)
Cbiot	Centro de Biotecnologia da UFRGS
CDC	*Center of Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos)
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIPARS	*Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance* (Programa Integrado Canadense para Vigilância da Resistência Antimicrobiana)
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
DNA	*Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
DTA	Doença transmitida por alimento
ECDC	*European Centre for Disease Prevention and Control* (Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças)
EFSA	*European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)
EUA	Estados Unidos da América
FDA	*US Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos)
Fiocruz	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
g	Força gravitacional
kb	Quilobase (= 1.000 pares de base)
Kg	Quilograma
LPS	lipopolissacarídeo
min.	Minutos
mL	Mililitro

OIE	*World Organization for Animal Health* (Organização Mundial da Saúde Animal)
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
PFGE	*Pulsed Field Gel Electrophoresis* (eletroforese em gel de campo pulsado)
pH	Potencial Hidrogeniônico
pmol	Picomol
PT	*Phage Type* (fagotipo)
rpm	Rotações por Minuto
RS	Rio Grande do Sul
seg.	Segundos
SPI	*Salmonella Pathogenicity Island* (ilha de patogenicidade de *Salmonella*)
TSA	*Trypticase Soy Agar* (ágar tripticase de soja)
TSB	*Trypticase Soy Broth* (caldo tripticase de soja)
TTSS	*Type Three Secretion System* (Sistema de Secreção do Tipo III)
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia por Mililitro
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA	*United States Department of Agriculture* (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos)
WHO	*World Health Organization* (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior
≥	Maior ou igual
<	Menor
≤	Menor ou igual
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
H_2S	Ácido sulfídrico
$MgCl_2$	Cloreto de Magnésio
U	Unidade
χ^2	Teste do Qui-Quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 14
2 OBJETIVOS..... 16
2.1 Objetivo Geral..... 16
2.2 Objetivos Específicos..... 16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... 17
3.1 Família *Enterobacteriacea* e gênero *Salmonella*..... 17
3.1.1 Características morfológicas e bioquímicas..... 17
3.1.2 Classificação..... 17
3.2 Patogenia da salmonelose..... 19
3.2.1 Infecção nas aves..... 19
3.2.2 Infecção no homem..... 20
3.3 Epidemiologia e importância das salmoneloses em saúde pública..... 21
3.4 Principais sorovares e fagotipos de *Salmonella* spp...... 22
3.5 *Salmonella* como produtora de biofilmes..... 24
3.6 Resistência aos antimicrobianos..... 26
3.7 Patogenicidade e virulência..... 29
3.7.1 Fatores de virulência associados à estrutura bacteriana..... 30
3.7.2 Fatores de virulência associados às Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*..... 31
3.7.3 Fatores de virulência associados aos plasmídeos..... 32
3.8 Diferenciação entre as cepas de *Salmonella* spp...... 32
3.8.1 Diferenciação através da ribotipificação por reação em cadeia da polimerase e do sequenciamento..... 33
4 MATERIAIS E MÉTODOS..... 35
4.1 Local de realização dos experimentos..... 35
4.2 Cepas de *Salmonella* spp...... 35
4.3 Reativação e confirmação da pureza das cepas..... 36
4.4 Análises estatísticas..... 37
5 EXPERIMENTOS..... 38
5.1 Experimento I - Avaliação da capacidade de produção de biofilmes..... 38
5.1.1 Materiais e métodos..... 38
5.1.2 Resultados e discussão..... 39

5.2 Experimento II – Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana..... 50
5.2.1 Materiais e métodos..... 50
5.2.2 Resultados e discussão..... 52
5.3 Experimento III – Pesquisa de genes associados à virulência..... 67
5.3.1 Materiais e métodos..... 67
5.3.2 Resultados e discussão..... 67
5.4 Experimento IV – Determinação molecular do fagotipo PT4 de *Salmonella* Enteritidis..... 80
5.4.1 Materiais e métodos..... 80
5.4.2 Resultados e discussão..... 80
5.5 Experimento V – Diferenciação genética de *Salmonella* Enteritidis através da ribotipificação por PCR e do sequenciamento..... 83
5.5.1 Materiais e métodos..... 83
5.5.2 Resultados e discussão..... 85
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 89
7 CONCLUSÕES..... 91
REFERÊNCIAS..... 92
APÊNDICE A – Listas das cepas utilizadas no estudo, conforme o grupo de origem..... 115
APÊNDICE B – Pesquisa de genes associados à virulência..... 122
PUBLICAÇÕES E ARTIGOS RELACIONADOS..... 128

1 INTRODUÇÃO

Com a crise política e econômica enfrentada pelo Brasil em 2015, estima-se uma retração de 2,7% do Produto Interno Bruto (AVEWORLD, 2015). Neste contexto, o agronegócio, que corresponde a 40% do faturamento das exportações, pode ser um dos únicos setores da economia nacional a registrar crescimento (BRASIL ECONÔMICO, 2015). Estima-se que a balança comercial do país estaria negativa em US$ 34 bilhões sem as exportações do agronegócio. Entre as atividades que compõe o agronegócio brasileiro, destaca-se o complexo da soja seguido pelo complexo de carnes, em que a carne bovina e a de frango são as mais importantes (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014).

Nas últimas décadas, a produção brasileira de frango tem sido um importante fator de desenvolvimento econômico e social para o país. Conforme os dados da Associação Brasileira de Proteína Animal, o Brasil deve permanecer em destaque na produção e na exportação de carne de frango nos próximos anos (AVEWORLD, 2015). Dados preliminares indicam que a produção brasileira de carne de frango em 2015 foi de aproximadamente 13,100 milhões de toneladas (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2015). Com este resultado, a produção brasileira supera a chinesa, o que faz do Brasil o segundo maior produtor mundial de frango, atrás apenas dos Estados Unidos (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2015). Estima-se que a exportação do produto brasileiro atingiu o patamar de 4,260 milhões de toneladas em 2015, representando um aumento de cerca de 4% em relação a 2014 (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2015). Com este desempenho, o Brasil permanece como o maior exportador mundial há mais de dez anos (AVEWORLD, 2015; AVICULTURA INDUSTRIAL, 2015). Os três estados da região sul do Brasil foram responsáveis por aproximadamente 75% da exportação brasileira de carne de frango em 2014, sendo o Rio Grande do Sul (RS) responsável por 18,35% (ABPA, 2015). O consumo per capita estimado para o Brasil em 2015 é de 43Kg/habitante/ano (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2015). A recessão econômica e os altos preços da carne bovina nos últimos anos favoreceram a transferência de consumo para a carne de frango, considerada a de menor custo entre as principais carnes (AVEWORLD, 2015; BEEF POINT, 2015).

A globalização fez com que a indústria alimentícia em todo mundo aumentasse a produção de alimentos, levando a uma expansão da avicultura industrial. O aumento do número e da concentração de aves no ambiente de produção elevou o risco de disseminação de doenças (BELUSSO; HESPANHOL, 2010). Entre estas doenças, têm

especial importância aquelas que podem ser transmitidas ao homem através dos alimentos, como a salmonelose. A infecção das aves por *Salmonella* spp. ocasiona problemas econômicos e de saúde pública (BORSOI; FRANÇA; GONSALVES, 2011). *Salmonella* spp. é considerado um dos principais agentes causadores de infecção alimentar em humanos, sendo os produtos de origem avícola as principais fontes de contaminação (CDC, 2013; CDC, 2014).

Com a crescente preocupação dos mercados consumidores com a qualidade destes produtos, o mercado brasileiro necessita oferecer garantias do controle da contaminação dos alimentos. O sucesso deste controle está relacionado à vigilância epidemiológica das cepas circulantes através do emprego de técnicas fenotípicas e moleculares que caracterizem as linhagens entre os diferentes sorovares e entre as diferentes fontes de isolamento. A resistência antimicrobiana e a presença de determinadas características patogênicas em surtos de salmonelose em humanos podem estar relacionadas com as cepas circulantes na produção animal. Por estas razões, conhecer as características das populações de *Salmonella* spp. que circulam tanto nos animais quanto nos humanos é essencial para entender os mecanismos de associação entre estas cadeias.

O objetivo deste projeto é caracterizar fenotípica e genotipicamente cepas de *Salmonella* spp. de diferentes sorovares oriundas de três fontes de isolamento: matrizes e frangos de corte no campo, carcaças de frango de matadouros-frigoríficos e alimentos envolvidos em surtos de salmonelose.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Salmonella* spp. pertencentes a diferentes sorovares e isoladas de três origens: da produção de matrizes e de frangos de corte (ambiente e órgãos de aves), de carcaças de frango de corte (matadouros-frigoríficos) e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose no Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade de formação de biofilmes de cepas de *Salmonella* spp. em placas de poliestireno a 37ºC, 28ºC, 12ºC e 3ºC, comparando-se a produção de biofilmes entre cepas de diferentes origens e entre cepas de distintos sorovares.
- Determinar o perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. através do teste de disco-difusão em ágar, comparando-se este perfil entre cepas de diferentes origens e entre cepas de distintos sorovares.
- Detectar genes associados à resistência antimicrobiana em cepas classificadas como multirresistentes no teste fenotípico.
- Caracterizar genotipicamente as cepas de *Salmonella* spp. através da pesquisa de genes de virulência, comparando-se a frequência dos genes entre cepas de diferentes origens e entre cepas de distintos sorovares.
- Determinar quais cepas de *Salmonella* Enteritidis pertencem ao fagotipo 4 (PT4) através da técnica de reação em cadeia da polimerase.
- Determinar se existe relação clonal entre as cepas de *Salmonella* Enteritidis circulantes na cadeia avícola e em surtos de salmonelose em humanos através da ribotipificação por PCR e do sequenciamento de DNA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família *Enterobacteriaceae* e gênero *Salmonella*

A família das enterobactérias possui mais de 25 gêneros bacterianos, incluindo um grande número de patógenos como *Escherichia coli*, *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Salmonella* spp. entre outros. Estudos genéticos e moleculares estimam que os genomas de *E. coli* e de *Salmonella enterica* possuam uma diferença de apenas 10% nas suas sequências de DNA, sugerindo que estas espécies tenham derivado de um ancestral comum, há mais de 100 milhões de anos (JONG *et al.*, 2012; WISNER *et al.*, 2012).

3.1.1 Características morfológicas e bioquímicas

O gênero *Salmonella* está amplamente distribuído no ambiente em todo o mundo. Foi isolado e identificado pela primeira vez em 1885 por Daniel Elmer Salmon. É um bacilo curto, Gram negativo, aeróbio e anaeróbio facultativo, em geral não encapsulado, não formador de esporo e móvel, com exceção dos sorovares *S.* Pullorum e *S.* Gallinarum. A temperatura para ótimo crescimento é de 37ºC, mas também cresce entre 5°C e 45°C. Cresce em pH entre 4 e 9, sendo 7 o pH ideal. Os membros deste gênero são oxidase negativos, catalase positivos, indol, urease e Voges Proskauer negativos, vermelho de metila e citrato de Simmons positivos, lisina e ornitina descaboxilase positivos. A maioria dos sorovares produz ácido sulfídrico (H_2S). A glicose e outros carboidratos são metabolizados com produção de gás e ácido pela maioria dos sorovares. Normalmente são fermentadores de arabinose, sorbitol, maltose, manitol, manose, ramnose, trealose e xilose, porém não fermentam a lactose e a sacarose (GAST, 1997; GAST, 2008; WISNER *et al.*, 2012).

3.1.2 Classificação

O gênero *Salmonella* consiste de apenas duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. Cepas pertencentes à espécie *S. bongori* estão geralmente associadas aos animais de sangue frio e ao ambiente. A espécie *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica* (I), *S. enterica* subespécie *salamae* (II), *S. enterica* subespécie *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subespécie *diarizonae* (IIIb), *S. enterica*

subespécie *houtenae* (IV) e *S. enterica* subespécie *indica* (VI). Bactérias classificadas como *Salmonella enterica* subespécie *enterica* consistem em 99,5% dos microrganismos isolados de infecções por *Salmonella* em humanos e animais. Essas subespécies podem ser diferenciadas bioquimicamente. (POPOFF; LE MINOR, 1997; BRENNER *et al.*, 2000; GRIMONT; WEILL, 2007, BARROW; JONES; THOMSON, 2010; WISNER *et al.*, 2012).

Além da classificação em espécies e subespécies, também é realizada a classificação em sorogrupos e sorovares. *Salmonella* spp., assim como outras enterobactérias, possui antígenos O (somáticos) e antígenos H (flagelares). Alguns sorovares também possuem o antígeno Vi (capsular) (BRENNER *et al.*, 2000). As subespécies de *Salmonella* spp. são divididas em mais de 50 sorogrupos (FIELDS, 2006; JONG *et al.*, 2012; WISNER *et al.*, 2012), classificados com base na composição de antígenos O (POPOFF; BOCKEMÜHL; BRENNER *et al.*, 2000; WISNER *et al.*, 2012). Os principais sorogrupos são A, B, C_1, C_2, D_1, E_1 e G, sendo 97% dos isolados de casos clínicos em humanos classificados em um destes grupos (FIELDS, 2006). No grupo B estão os sorovares *S.* Typhimurium e *S.* Heidelberg, no grupo C está *S.* Hadar e no grupo D_1 destaca-se *S.* Enteritidis. A classificação em sorovares é realizada com base nas características bioquímicas e na composição de antígenos O e H da cepa (GAST, 2008). No passado, a maior parte dos sorovares foi denominada conforme a doença relacionada (*S.* Typhi, *S.* Paratyphi), o hospedeiro específico (*S.* Abortusovis, *S.* Cholerasuis, *S.* Pullorum, *S.* Gallinarum) ou a região geográfica do primeiro isolamento (*S.* Panamá, *S.* Canadá, *S.* Tennessee). Atualmente, já foram identificados mais de 2.600 sorovares do gênero *Salmonella*, sendo que cerca de 60% destes pertencem à subespécie *enterica* (GRIMONT; WEILL, 2007; BARROW; JONES; THOMSON, 2008; GUIBOURDENCHE *et al.*, 2010; WISNER *et al.*, 2012).

Apesar da estreita relação genética entre os sorovares de *S. enterica* subespécie *enterica*, existem diferenças de virulência, adaptação e especificidade ao hospedeiro. Por esta razão, os sorovares podem ser divididos em três grupos: sorovares capazes de causar doença sistêmica e/ou local em múltiplos hospedeiros, como *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium; sorovares adaptados a um hospedeiro, mas que podem causar doença em outros, como *S.* Dublin e *S.* Cholerasuis; sorovares de hospedeiro restrito, como *S.* Gallinarum e *S.* Pullorum (HEITHOFF *et al.*, 2008). A existência de um grande número de sorovares identificados possivelmente está associada à capacidade de *Salmonella* em transferir, adquirir e recombinar genes flagelares e somáticos (LAGATOLLA *et al.*,

1996). Apesar de um grande número de sorovares já terem sido identificados, somente cerca de 50 são frequentemente isolados de casos de salmonelose em humanos e animais (JAY, 2005).

3.2 Patogenia da salmonelose

3.2.1 Infecção nas aves

Salmonella spp. pode causar três doenças nas aves: Pulorose, Tifo e Paratifo Aviário. A Pulorose é uma doença causada por *S.* Pullorum que geralmente acomete aves jovens com menos de três semanas de idade. A transmissão ocorre de forma horizontal, através do contato direto com aves portadoras, roedores e aves silvestres, ou vertical, pelas vias transovariana e extragenital. A sintomatologia em aves jovens é caracterizada pela presença de uma diarreia pastosa de coloração esbranquiçada e alta mortalidade. As aves adultas geralmente permanecem assintomáticas (GAST, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). O Tifo é causado por *S.* Gallinarum, sendo mais comum em aves adultas. A transmissão ocorre principalmente pela via horizontal, através do contato de aves suscetíveis com aves portadoras, roedores e aves silvestres. O principal sinal clínico é a presença de diarreia amarelo-esverdeada. Na necropsia observa-se uma coloração marrom-esverdeada ("bronzeada") do fígado (CHARLTON *et al.*, 2006; SHIVAPRASADI; BARROW, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). No passado, estas duas doenças representavam um grande problema para a indústria avícola, pois ocasionavam perdas econômicas nos planteis devido à diminuição do ganho de peso, às condenações ao abate e ao aumento da mortalidade. Com a intensificação das medidas de controle e biosseguridade, estes sorovares foram reduzidos consideravelmente dos planteis avícolas industrializados (SILVA; DUARTE, 2002; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). Entretanto, o isolamento de *S.* Gallinarum nos planteis tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (dados não publicados).

O Paratifo Aviário é causado pelos sorovares de *Salmonella* que não são adaptados às aves, como *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium (GAST, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). Estes sorovares são mais importantes em questões de saúde pública do que pelo impacto econômico que causam em planteis acometidos, sendo os principais responsáveis pelas infecções alimentares em humanos (CHARLTON *et al.*,

2006). As aves jovens são mais suscetíveis, podendo apresentar uma sintomatologia semelhante àquela causada por *S.* Pullorum. As aves mais velhas são mais resistentes e geralmente permanecem assintomáticas ou apresentam uma queda de postura de até 10%. Os sorovares causadores do Paratifo podem permanecer no trato digestivo das aves até o abate, onde pode ocorrer a contaminação do produto final. Nas aves poedeiras, a bactéria permanece no trato reprodutor, podendo contaminar os ovos produzidos (CHARLTON *et al.*, 2006; GAST, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

3.2.2 Infecção no homem

A principal forma de transmissão para o homem ocorre através do consumo de alimentos contaminados, principalmente carnes e ovos. O período de incubação pode variar de 6 até 48 horas (DARWIN; MILLER, 1999; FORSHELL; WIERUP, 2006; CDC, 2014). Após a ingestão oral, as bactérias que sobrevivem ao baixo pH provocado pela produção de ácido clorídrico colonizam o intestino, principalmente na região das placas de Peyer, onde estão localizadas as células M. Depois da colonização intestinal, *Salmonella* spp. invade as células M e os enterócitos, com auxílio dos Sistemas de Secreção do Tipo III (*Type Three Secretion System* - TTSS) (GAL-MOR, 2010; KARASOVA *et al.*, 2010). Estudos com a inoculação experimental de camundongos demonstram que 80% das bactérias ingeridas que resistem ao baixo pH são eliminadas diretamente nas fezes, 15% permanecem na superfície das células intestinais e apenas 5% delas invadem o epitélio (BÄUMLER *et al.*, 1997). Após a invasão celular, as células bacterianas são fagocitadas por macrófagos. Quando estes conseguem conter a disseminação do microrganismo, a infecção fica restrita ao trato digestivo. Entretanto, se a bactéria superar as defesas do hospedeiro e permanecer viável dentro dos macrófagos, ela pode multiplicar-se e se disseminar em todo o organismo, provocando uma infecção sistêmica (BÄUMLER *et al.*, 1997; KARASOVA *et al.*, 2010). Através de proteínas efetoras, bombeadas para o interior das células através dos TTSS, a bactéria provoca a apoptose desses macrófagos e, utilizando um segundo tipo de sistema de secreção, consegue sair da célula e retornar para o lúmen intestinal para ser eliminada através das fezes (GAL-MOR, 2010; KARASOVA *et al.*, 2010). Esta sequência de fatos resulta em lesão dos vilos intestinais e na redução da superfície de absorção. A presença de *Salmonella* spp. também faz com que ocorra influxo de células polimorfonucleares para

a mucosa infectada, ocasionando uma diarreia aquosa que pode conter sangue (WALLIS; GALYOV, 2000).

Os sinais clínicos geralmente incluem diarreia, náusea, dor abdominal e febre, mas também podem ocorrer vômitos, anorexia, prostração e dores de cabeça. Os pacientes normalmente se recuperam em até uma semana, não sendo frequentes os casos de óbito (FORSHELL; WIERUP, 2006). A severidade da doença depende do sorovar e da imunidade do hospedeiro. Paciente jovens, idosos ou imunologicamente debilitados tendem a apresentar quadros clínicos mais severos, enquanto que a enterite é geralmente autolimitante em adultos saudáveis (WALLIS; GALYOV, 2000).

3.3 Epidemiologia e importância das salmoneloses em saúde pública

A *Salmonella* é considerada uma bactéria cosmopolita, com distribuição em praticamente todos os países (VIEIRA *et al.*, 2009). Mesmo com a crescente preocupação com patógenos emergentes nos últimos anos, *Salmonella* spp. continua sendo o principal agente causador de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em praticamente todo o mundo, segundo a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization* - WHO) (WHO, 2014). O número exato de casos clínicos não é conhecido devido às subnotificações. Conforme a WHO, um terço da população mundial é acometido por DTA, mas apenas uma pequena parcela destes casos é notificada. Existe a estimativa de que para cada caso diagnosticado e reportado, existam outros 38 não diagnosticados ou não informados (MEAD *et al.*, 1999; FOLEY; LYNNE, 2008). Estima-se que ocorram mais de 1 bilhão de casos de salmonelose em todo o mundo a cada ano (PUI *et al.*, 2011). Conforme dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Center for Disease Control and Prevention* - CDC), 48 milhões de pessoas ficam doentes e 3.000 morrem por ano em decorrência das doenças transmitidas por alimentos nos Estados Unidos. Deste total, acredita-se que aproximadamente 1 milhão dos casos sejam causados por *Salmonella* spp., resultando em aproximadamente 20.000 hospitalizações e 400 mortes a cada ano (CDC, 2016). A Autoridade Europeia para Segurança dos Alimentos (*European Food Safety Authority* – EFSA) estima que as perdas econômicas ocasionadas pela infecção por *Salmonella* spp. sejam próximas a 3 bilhões de euros (EFSA, 2015). Os dados do CDC indicam que as infecções por *Escherichia coli* O157:H7, *Shigella* spp. e *Yersinia* spp. diminuíram entre 1996 e 2010, mas aquelas provocadas por *Salmonella* spp. aumentaram ou permaneceram em níveis semelhantes (CDC, 2013;

CDC, 2014). Por outro lado, o Centro Europeu de Controle e Prevenção de Doenças (*European Center for Disease Prevention and Control* – ECDC) reporta a diminuição em 32% do número de casos de salmonelose em humanos ocorridos na Europa entre 2008 e 2012 (ECDC, 2015b).

No Brasil, *Salmonella* spp. foi responsável por 14,4% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos entre 2000 e 2015. Considerando-se apenas os casos em que o principal agente foi identificado, *Salmonella* spp. esteve envolvida em 34,7% dos surtos, sendo considerada o principal patógeno neste período (BRASIL, 2015c). Entre 2000 e 2015, 75% dos casos de DTA, incluindo *Salmonella* spp. e outros agentes, foram notificados nas regiões sul e sudeste, sendo que 34,8% ocorreram apenas na região sul (BRASIL, 2015c). Porém, é possível que este alto número de casos registrados nestas regiões seja devido a maior notificação e investigação, quando comparado a outras regiões do país. No período de 2007 a 2010, o RS notificou 386 surtos de DTA com ocorrência de oito óbitos. Excluindo-se os surtos sem informação do agente causador, *Salmonella* spp. foi identificada em 68,1% destes casos (BRASIL, 2011). Dados publicados por Tondo e Ritter (2012) mostram que 23.725 pessoas estiveram envolvidas em surtos de infecções com *Salmonella* spp. no RS entre 2002 e 2004, sendo que 1.938 precisaram ser hospitalizadas.

Avaliando-se os casos de salmonelose humana, acredita-se que 67% deles estão relacionados ao consumo de produtos de origem animal, desconsiderando-se a transmissão por frutos do mar e produtos lácteos. Os produtos de origem avícola são os mais comumente relatados, sendo responsáveis por até 47% do total das infecções, quando são analisados ovos e carnes (CDC, 2013).

3.4 Principais sorovares e fagotipos de *Salmonella* spp.

A prevalência dos sorovares de *Salmonella* spp. depende da região e da fonte de isolamento. Em relação aos casos de salmonelose em humanos, os dados oficiais europeus indicam *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis e *S.* Infantis como os principais sorovares isolados em humanos (ECDC, 2015a). *S.* Typhimurium, *S.* Enteritidis, *S.* Newport, *S.* Heidelberg e *S.* Javiana são os sorovares mais comuns nos Estados Unidos (FOLEY; LYNNE; 2008; ROBINSOM, 2014). No Brasil, os principais sorovares envolvidos em enteroinfecções por *Salmonella* até 2008 foram *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Senftenberg, *S.* Agona e *S.* Heidelberg (RODRIGUES, 2008).

Assim como em humanos, *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium também são frequentemente isolados de aves em todo o mundo. Além destes, *S.* Heidelberg, *S.* Kentucky e *S.* Senftenberg também estão entre os mais isolados (FOLEY; LYNNE, 2008). Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os principais sorovares encontrados em carcaças de frango e aves vivas no Brasil são *S.* Enteritidis, *S.* Infantis, *S.* Typhimurium, *S.* Heidelberg e *S.* Mbandaka (BRASIL, 2008). Dados mais recentes demonstram que a frequência de isolamento do sorovar *S.* Heidelberg, a partir de fontes avícolas, tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (ANDREATTI, 2014). No RS, os sorovares mais frequentemente isolados nos últimos 30 anos foram *S.* Gallinarum, *S.* Typhimurium, *S.* Heidelberg, *S.* Enteritidis e *S.* Infantis (TONDO; RITTER, 2012).

Estudos recentes têm sugerido que apesar de alguns sorovares serem comumente isolados na produção avícola, eles não são encontrados com frequência nos casos de salmonelose em humanos (BARROW; JONES; THOMSON, 2010; SALISBURY; BRONOWKSI; WIGLEY, 2011). Sugere-se que esta situação possivelmente se deva ao fato de que alguns sorovares são considerados mais invasivos que outros. Entretanto, os mecanismos exatos que favorecem a prevalência de determinados sorovares ainda não estão bem esclarecidos (SALISBURY; BRONOWKSI; WIGLEY, 2011).

A fagotipagem de *Salmonella* spp. consiste em uma metodologia muito útil para demonstrar possíveis relações entre as cepas envolvidas em surtos de salmoneloses (NSRL, 2015). *Salmonella* pertencente a diferentes sorovares podem ser diferenciadas em diferentes fagotipos (*phage type* - PT), conforme o padrão de suscetibilidade à lise por um grupo de fagos com diferentes especificidades (RABSCH, 2007). Estudos ao longo do tempo têm demonstrado que a prevalência dos fagotipos de *Salmonella* spp. varia entre os países e em diferentes regiões dentro de um país ao longo do tempo.

Em relação aos fagotipos de *S.* Enteritidis, tem sido observado um predomínio dos fagotipos PT8 e PT13a nos Estados Unidos. Entretanto, o PT4 é o mais frequente na Europa e no Brasil, tanto em cepas isoladas de humanos quanto de aves (LIEBANA *et al.*, 2002; SILVA; DUARTE, 2002; NUNES *et al.*, 2003; ALCOCER *et al.*, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2007; KALENDER *et al.*, 2009; VAZ *et al.*, 2010). Apesar de o PT4 ser o mais prevalente no Brasil, a ANVISA também destaca a importância dos fagotipos PT1, PT5 e P17a (BRASIL, 2008; BRASIL, 2015a).

Até o início da década de 90, o fagotipo mais frequentemente identificado nas cepas de *S.* Enteritidis circulantes no Brasil era o PT8. A partir de 1993, o isolamento de

PT4 aumentou consideravelmente no país. Acredita-se que este fagotipo tenha sido introduzido no Brasil através da importação de aves de outros países (IRINO *et al*., 1996). O PT4 está relacionado com infecções em humanos (BACK, 2010) e em aves, sendo patogênico tanto para poedeiras quanto para frangos de corte (ALTEKRUSE *et al.*, 1993). As cepas de *S.* Enteritidis pertencentes a este fagotipo são consideradas como altamente patogênicas para o homem, apesar de existirem variações quanto à patogenicidade dentro de um mesmo fagotipo (BACK, 2010), e estão associadas com o consumo de produtos de origem avícola, especialmente os ovos (FOOD SAFETY, 2015b).

3.5 *Salmonella* como produtora de biofilmes

No ciclo de vida de *Salmonella* spp., a colonização no hospedeiro é alternada com períodos de sobrevivência no ambiente. Para sobreviver no ambiente, a *Salmonella* spp. desenvolveu diversos mecanismos, entre eles o de aderir às superfícies e produzir biofilmes (PIRAS *et al.*, 2015). Os biofilmes são comunidades celulares formadas por microrganismos de uma mesma espécie ou de espécies diferentes que estão aderidos entre si e a uma superfície inerte ou viva, envoltas por uma matriz extracelular, formada principalmente por exopolissacarídeos (CARPENTIER; CERF, 1993; COSTERTON *et al.*, 1995; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; DONLAN; COSTERTON, 2002; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009; SHEFFIELD; CRIPPEN, 2012; STEENACKERS *et al.*, 2012; PEÑA, 2015).

Os principais componentes da matriz extracelular são a curli e a celulose. A fímbria curli está envolvida com a adesão às superfícies, agregação celular, persistência no ambiente e com a produção de biofilmes (RÖMLING, 2005). A produção de celulose favorece a adesão em superfícies abióticas, aumenta a resistência e confere à bactéria a capacidade de interação célula-célula (RÖMLING *et al.*, 2000; RÖMLING, 2007). A expressão destes componentes pode ser demonstrada com o cultivo bacteriano em ágares indicadores suplementados com vermelho Congo e azul de Coomassie. Conforme a expressão destes componentes, as bactérias da família *Enterobacteriaceae* demonstram quatro diferentes morfotipos: rdar (curli e celulose presentes: colônias vermelhas, secas e rugosas), bdar (apenas curli presente: colônias marrons, secas e rugosas), pdar (apenas celulose presente: colônias rosas, secas e rugosas) e saw (curli e celulose ausentes: colônias brancas e lisas) (RÖMLING *et al.*, 2000; BOKRANZ *et al.*, 2005). Estudos demonstram que os componentes da matriz extracelular são muito importantes no

processo de sobrevivência de *Salmonella* spp. no ambiente (WHITE *et al.*, 2006; APEL *et al.*, 2009) e, por esta razão, o morfotipo rdar é considerado o mais importante para a produção de biofilmes (CABARKAPA *et al.*, 2015).

A formação do biofilme inicia com a atração dos microrganismos às superfícies sólidas onde existam nutrientes disponíveis para sua multiplicação (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009; HUNG; HENDERSON, 2009; JOO; OTTO, 2012). Os biofilmes se estabelecem quando a massa bacteriana é espessa o bastante para agregar nutrientes, resíduos e outros organismos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). Inicialmente ocorre a adesão de células planctônicas à superfície, sendo a motilidade e as estruturas adesivas muito importantes neste processo (HUNG; HENDERSON, 2009). Nesta fase a aderência é reversível (COSTERTON *et al.*, 1995). As bactérias aderidas se replicam e formam microcolônias. As modificações na expressão gênica destas bactérias permitem a excreção da matriz extracelular. Com a expansão das microcolônias, os biofilmes se tornam maduros (HUNG; HENDERSON, 2009). A aderência torna-se irreversível, quando o microrganismo está ancorado por apêndices ou por produção de polímeros extracelulares (COSTERTON *et al.*, 1995). As bactérias podem então se destacar deste biofilme e contaminar o ambiente (HUNG; HENDERSON, 2009).

Os biofilmes favorecem a sobrevivência em ambientes hostis, como matadouros-frigoríficos e plantas de processamento de alimentos, e a colonização de novos nichos, uma vez que as cepas que fazem parte destas estruturas apresentam características diferentes daquelas que estão em sua forma livre (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009; HUNG; HENDERSON, 2009; PEÑA, 2015; PIRAS *et al.*, 2015). As vantagens destas formações para os microrganismos incluem maior resistência às forças físicas, ao sistema imune do hospedeiro e às moléculas tóxicas (antimicrobianos e desinfetantes), além de cooperação metabólica e compartilhamento de DNA de forma mais eficiente, ocasionando uma maior disseminação gênica (STEWART; COSTERTON, 2001; STEPANOVIĆ *et al.*, 2007; HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2009; HUNG; HENDERSON, 2009; STEENACKERS *et al.*, 2012; WOLCOTT *et al.*, 2013). Sistemas de produção de alimentos de origem animal são locais propícios à formação de biofilmes, pois oferecem as condições necessárias para o desenvolvimento destas estruturas (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Quando ocorrem falhas no processo de higienização, os resíduos podem ficar aderidos aos equipamentos e às superfícies, transformando-se em potenciais substratos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Além das perdas econômicas devido à corrosão das instalações e dos equipamentos, a formação dos biofilmes também pode levar à deterioração e à produção de odores desagradáveis nos produtos alimentícios (HUNG; HENDERSON, 2009; PIRAS *et al.*, 2015). Os biofilmes também são um grande problema em saúde pública, pois a ruptura das estruturas formadas nestes sistemas provoca a liberação de microrganismos patogênicos e, consequentemente, a contaminação dos produtos (COSTERTON *et al.*, 1995). Entretanto, a formação de biofilmes não é importante apenas para a indústria alimentícia, mas também para os ambientes hospitalares, pois eles podem ser formados em equipamentos e em materiais, como cateteres e implantes (STEPANOVIĆ *et al.*, 2007; HUNG; HENDERSON, 2009).

Por muitos anos, as pesquisas eram desenvolvidas considerando-se apenas as bactérias planctônicas. Atualmente já se reconhece os biofilmes como a forma predominante de crescimento bacteriano, pois permitem a sobrevivência dos microrganismos frente ao estresse ambiental (HUNG; HENDERSON, 2009; SHEFFIELD; CRIPPEN, 2012). O Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos estima que aproximadamente 80% das infecções bacterianas em humanos, inclusive aquelas causadas por *Salmonella* spp., podem estar relacionadas aos biofilmes (CHMIELEWSKI; FRANK, 2006; HUNG; HENDERSON, 2009).

A capacidade de cepas isoladas no campo de formarem biofilmes depende da sua adaptação ao ambiente. Por esta razão, o controle e a prevenção da formação inicial destas estruturas é de grande importância, a fim de se evitar a manutenção de um reservatório da bactéria e de se manter a qualidade do produto final (SCHONEWILLE *et al.*, 2012).

3.6 Resistência aos antimicrobianos

A importância de *Salmonella* spp. na saúde pública não se deve apenas a sua alta frequência de isolamento em surtos, mas também devido à grande resistência antimicrobiana que este microrganismo apresenta (FOLEY; LYNNE, 2008; TONDO; RITTER, 2012). Estudo recente publicado pela União Europeia demonstra o aumento da resistência de *Salmonella* spp. isolada de humanos e de animais aos antimicrobianos mais comumente utilizados para o tratamento da salmonelose (EFSA; ECDC, 2015). O número de sorovares altamente resistentes aos antimicrobianos não tem aumentado drasticamente nos últimos anos, mas continua a representar uma ameaça à saúde pública (KRIETSCH, 2014). Também existe uma grande preocupação com a ocorrência de surtos de

salmonelose em humanos com cepas altamente resistentes (TONDO; RITTER, 2012), uma vez que nestes casos é necessária a utilização de medicamentos mais caros, e o tratamento é, em geral, menos eficaz (KRIETSCH, 2014).

Quando o emprego dos antimicrobianos é realizado de forma incorreta ou indiscriminada, ocorre um aumento da pressão seletiva para o fármaco, podendo ocasionar o aparecimento de microrganismos resistentes (KOLUMAN; DIKICI, 2013). A presença de cepas resistentes nos animais destinados ao consumo humano é de grande preocupação em saúde pública, uma vez que eles podem servir de carreadores. Estas bactérias resistentes podem contaminar os produtos finais e provocar o desenvolvimento de infecções no homem com agentes altamente resistentes aos antimicrobianos (ALMEIDA; PALERMA-NETO, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; FOOD SAFETY, 2015c).

A utilização de antimicrobianos na produção animal se tornou comum devido à necessidade do aumento da quantidade de alimento a ser produzido (KOLUMAN; DIKICI, 2013). Dados do órgão americano de Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration* – FDA) indicam que o uso de antimicrobianos nos animais de produção nos Estados Unidos aumentou cerca de 20% entre 2009 e 2013. Segundo este mesmo órgão, 69% dos antimicrobianos vendidos em 2013 para uso veterinário foram destinados a tratamentos terapêuticos e/ou com finalidade de ganhos na produção, 30% para uso terapêutico exclusivo e 1% com a finalidade exclusiva de incrementar os ganhos produtivos. Relatórios do FDA também indicam que, de todos os antimicrobianos vendidos para uso na produção animal, 62% correspondem aos antimicrobianos mais importantes e mais comuns para o tratamento de infecções em humanos (FDA, 2015). Em 2013, a venda de tetraciclinas e penicilinas correspondeu, respectivamente, a 71% e 9% do total (FDA, 2015; FOOD SAFETY, 2015a).

Quanto à administração de agentes antimicrobianos em animais de produção, no Brasil já foi totalmente proibido o uso de cloranfenicol, nitrofuranos, olaquindox e carbadox, independentemente da finalidade (BRASIL, 2003; BRASIL, 2004; BRASIL, 2005). A administração de eritromicina, espiramicina, penicilinas, tetraciclinas e sulfonamidas sistêmicas deve ser restrita ao uso terapêutico, sendo proibida a utilização como aditivo de ração (BRASIL, 2009; BRASIL, 2012). Não existem restrições de uso para os demais antimicrobianos, mas o monitoramento de resíduos no produto final deve ser feito periodicamente (BRASIL, 2010). Contudo, esta medida apenas detecta se o

período de carência foi respeitado, mas não impede a seleção de cepas bacterianas resistentes. Apesar de a resistência ser observada desde a introdução dos agentes antimicrobianos nas áreas médica e veterinária, é possível que a resistência de alguns agentes bacterianos, tais como *Salmonella* spp. e *Campylobacter jejuni*, tenha iniciado no campo (KOLUMAN; DIKICI, 2013).

A utilização dos testes *in vitro* é importante para a escolha do antimicrobiano a ser utilizado para o tratamento das infecções. Estes testes são essenciais para os patógenos que possuem mecanismos de resistência adquirida, como os membros da família das enterobactérias (JORGENSEN; FERRARO, 2009). Existem diversos testes *in vitro* que podem ser utilizados para avaliação da suscetibilidade e da resistência de um patógeno, sendo o teste de disco-difusão em ágar e a microdiluição em placa os mais comuns. Ambos os testes são padronizados pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical and Laboratorial Standards Institute* - CLSI) (CLSI, 2014a). As principais vantagens do teste de disco-difusão são a simplicidade, a praticidade e o baixo custo. Por outro lado, este oferece apenas um resultado qualitativo. A principal vantagem do teste da microdiluição em placa é a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), obtendo-se um resultado quantitativo e mais preciso (CLSI, 2008; JORGENSEN; FERRARO, 2009).

Apesar de não existir uma denominação padrão, autores sugerem que a classificação de multirresistente deve ser utilizada apenas para aquelas cepas que são resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (SCHWARZ *et al.*, 2010; MAGIORAKOS *et al.*, 2012). O aparecimento de cepas multirresistentes tem aumentado em todo o mundo ao longo dos últimos anos (LERTWORAPREECHA; SUTTHIMUSIK; TONTIKAPONG, 2013), mas é importante considerar que, além da resistência nos animais, também a resistência em humanos é importante para o aumento no número de microrganismos multirresistentes (ROSENGREN; GOW; WEESE, 2009).

Diversos mecanismos de resistência antimicrobiana já foram descritos, tais como mudanças na permeabilidade da parede celular bacteriana, bombas de efluxo, modificação enzimática do antimicrobiano, degradação do antimicrobiano e aquisição de vias metabólicas alternativas (VAN HOEK *et al.*, 2011). Por ser um processo de evolução bacteriana, nem todos os mecanismos de *Salmonella* spp. para a resistência são conhecidos (LOPES, 2014). A maioria dos mecanismos desenvolvidos pelas bactérias para sobreviver à ação antimicrobiana é codificada por genes de resistência que podem estar presentes em algumas cepas de *Salmonella* spp. (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013)

e incluem desde mutações em genes endógenos até aquisição horizontal de genes de resistência (FRYE; JACKSON, 2013).

Ainda que não esteja clara a origem destes genes, é possível que muitos estejam relacionados aos microrganismos naturalmente produtores de antibióticos, que teriam estes genes como forma de proteção contra a substância produzida. Outros podem ter sido adquiridos a partir de mutações de genes considerados essenciais às bactérias (ÁLVAREZ, 2007; MADIGAN *et al.*, 2010). Os genes de resistência geralmente estão inseridos em cassetes gênicos que podem incluir genes de múltipla resistência. Estes cassetes podem estar associados aos integrons, que facilitam a expressão gênica. Os integrons também constituem um elemento importante na mobilidade destes genes tanto dentro do genoma bacteriano, quanto na transferência horizontal entre as bactérias. Os cassetes gênicos podem estar associados também com sequências de inserção, transposons, bacteriófagos e plasmídeos, que também exercem uma função importante na transmissão destes cassetes (ÁLVAREZ, 2007; FOLEY; LYNNE, 2008; FRYE; JACKSON, 2013). A localização dos cassetes varia conforme o país ou região de isolamento da cepa, com o hospedeiro e com o ambiente ao qual a cepa está exposta (FRYE; JACKSON, 2013). Os genes de resistência podem ser transferidos horizontalmente entre bactérias de uma mesma espécie ou entre membros de diferentes gêneros ou espécies (THOMAS; NIELSEN, 2005). Ou seja, estes genes de resistência podem ser transmitidos para outras cepas de *Salmonella* spp., mas também para bactérias comensais do homem, como *E. coli* e *Enterococcus* spp. (ÂNGULO *et al.*, 2004).

3.7 Patogenicidade e virulência

A capacidade e a forma como o patógeno se adapta às condições no interior do hospedeiro dependem da virulência da cepa (MADIGAN *et al.*, 2010). A virulência e a patogenicidade estão intimamente relacionadas a diversos determinantes ou fatores de virulência, que distinguem os microrganismos patogênicos de outros da mesma espécie (FORSHELL; WIERUP, 2006; VIEIRA, 2009). Hospedeiros e microrganismos têm coevoluído ao longo de milhões de anos, período no qual as bactérias patogênicas têm modificado seus mecanismos de virulência e de resistência para se adaptarem às defesas do hospedeiro (BECEIRO; TOMÁS; BOU, 2013).

Os fatores de virulência são codificados por genes que conferem a estes patógenos a habilidade de superar desafios (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). Estes fatores

propiciam a invasão e a colonização das células infectadas, levando à ocorrência de uma série de eventos que favorecem o aparecimento da doença. Os fatores podem ser mecanismos de invasão, de interferência na resposta imune do hospedeiro, de resistência a antimicrobianos ou de produção de biofilmes, por exemplo (RODRIGUES, 2005; MIRMOMENI; KIANI; SISAKHTNEZHAD, 2008; VIEIRA, 2009; BARROW; JONES; THOMSON, 2010).

Apesar da similaridade do genoma dos diferentes sorovares de *Salmonella* spp., sabe-se que existem diferenças genéticas entre as cepas. Jong *et al.* (2012) relatam que, apesar de 90% dos genes de *S.* Typhi e *S.* Typhimurium serem idênticos, os 10% restantes incluem genes codificadores de fatores de virulência que irão determinar o potencial patogênico da cepa. Os genes associados aos fatores de virulência podem ser divididos em dois grupos: genes *housekeeping* e genes de virulência propriamente ditos ou verdadeiros (FORSHELL; WIERUP, 2006; CCFH, 2007). Os genes envolvidos nos processos de captação e/ou biossíntese de nutrientes, de resposta ao estresse e de recuperação dos danos à célula bacteriana são chamados de genes *housekeeping*. Estes genes são necessários para a manutenção da viabilidade da célula bacteriana e são comuns a bactérias de uma mesma família (CCFH, 2007). Os genes de virulência propriamente ditos são aqueles necessários para a adaptação da bactéria à célula infectada e para a superação dos mecanismos de defesa do hospedeiro. A expressão de ambos os grupos de genes depende das condições ambientais onde se encontra a bactéria, sendo geralmente ativada por genes regulatórios (FORSHELL; WIERUP, 2006).

3.7.1 Fatores de virulência associados à estrutura bacteriana

Alguns fatores de virulência estão relacionados aos componentes da estrutura bacteriana, como as fímbrias, os flagelos e o lipopolissacarídeo (LPS), e possuem um papel importante na virulência das cepas (CLOUTHIER *et al.*, 1993). As propriedades tóxicas do LPS, integrante da parede celular de bactérias Gram negativas, estão relacionadas ao lipídeo A. O LPS está associado com a indução de efeitos patofisiológicos no hospedeiro, como febre, hipotensão, leucocitose, inflamação, choque séptico e morte (PERRY, 1993; FREUDENBERG *et al.*, 2001). Os antígenos flagelares de fase 1 e de fase 2 são codificados por genes localizados em duas regiões diferentes no cromossomo, podendo ser transcritos de forma alternada (ECHEITA *et al.*, 2002). A variação de fase

flagelar pode estar relacionada com a capacidade da *Salmonella* spp. de não ser inativada pelo sistema de defesa do hospedeiro (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

As fímbrias são filamentos proteicos produzidos na superfície da bactéria (CLOUTHIER *et al.*, 1993; WISNER *et al.*, 2012) e que funcionam como adesinas, favorecendo a interação entre a bactéria e o hospedeiro no processo de colonização e de adesão inicial (ÁLVAREZ, 2007; WISNER *et al.*, 2012). Entre as fímbrias descritas para o gênero *Salmonella* estão: fímbria longa polar (*long polar fimbriae*), codificada pelo *operon lpf,* fímbria fina agregativa (*aggregative fimbriae*), codificada pelo *operon agf,* fímbria de *Salmonella* Enteritidis (*Salmonella Enteritidis fimbriae*), codificada pelo *operon sef,* e fímbria codificada por plasmídeo (*plasmid encoded fimbriae*), codificada pelo *operon pef* (ÁLVAREZ, 2007). Algumas fímbrias são também importantes durante o processo de formação de biofilmes, como a fímbria agregativa (GIBSON *et al.*, 2007; JONG *et al.*, 2012; WISNER *et al.*, 2012). A *Salmonella* spp. possui uma grande variedade de fímbrias, e cada sorovar possui uma combinação específica de *operons* fimbriais (JONG *et al.*, 2012).

3.7.2 Fatores de virulência associados às Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella*

As ilhas (mais de 10kb) ou ilhotas (menos de 10kb) genômicas são grandes elementos genéticos com propriedades diferentes do restante do genoma bacteriano. As ilhas com funções patogênicas em cepas de *Salmonella* spp. são chamadas de Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (*Salmonella Pathogenicity Island* – SPI) (HACKER; CARNIEL, 2001; BARROW; JONES; THOMSON, 2010; WISNER *et al.*, 2012). Atualmente já foram descritas mais de 21 SPI (WISNER *et al.*, 2012), mas as ilhas SPI-1 e SPI-2 são as mais importantes. A SPI-1 codifica as proteínas do sistema de secreção do tipo III (*Type Three Secretion System* - TTSS) (VIEIRA, 2009), além de outras proteínas necessárias para a invasão das células não fagocíticas e para a ativação da resposta inflamatória (MIRMOMENI; KIANI; SISAKHTNEZHAD, 2008; VIEIRA, 2009; JONG *et al.*, 2012; WISNER *et al.*, 2012). Os TTSS são complexos sistemas proteicos que servem como um canal para a secreção de proteínas efetoras para o citosol da célula eucariótica. Além dos genes codificadores de proteínas estruturais dos TTSS (*invA, prgH, sipB, orgA, spaN*), existem também os genes de proteínas que formam os poros (*sip*) para a secreção de proteínas efetoras (Sop, Avr, Sif, Siv) e reguladoras (Hil)

(ÁLVAREZ, 2007). Estas proteínas manipulam as cascatas sinalizadoras da célula hospedeira e possuem diferentes funções (JONG *et al.*, 2012; WISNER *et al.*, 2012).

Os genes localizados nas ilhas ou ilhotas são importantes no processo infeccioso de *Salmonella* spp., como por exemplo aqueles responsáveis pelo reconhecimento e pela multiplicação no interior de macrófagos (*spiA, msgA, pagC*). Os genes envolvividos no metabolismo do ferro (*iroN, sitC*) e aqueles codificadores de endotoxinas (*stn*, *cdtB*) são de especial importância para a virulência das cepas (ÁLVAREZ, 2007).

3.7.3 Fatores de virulência associados aos plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA que podem ser transmitidas entre as bactérias através da transferência horizontal. Esta transferência possibilita que os microrganismos adquiram genes que podem aumentar sua virulência ou resultar em uma maior resistência antimicrobiana. Entretanto, apenas algumas cepas de *Salmonella* spp. possuem este tipo de plasmídeo (JONG *et al.*, 2012). O *operon spv* é comum a todos os plasmídeos de virulência de *Salmonella* spp. e está relacionado à sobrevivência no interior dos macrófagos (ÁLVAREZ, 2007).

3.8 Diferenciação entre as cepas de *Salmonella* spp.

Apesar de estudos anteriores demonstrarem que todas as cepas de *Salmonella* spp. são semelhantes em pelo menos 70% do seu DNA, a classificação em sorovares é bastante limitada, uma vez que cepas de um mesmo sorovar podem ter uma relação genética mais distante (LAGATOLLA *et al.*, 1996). A caracterização epidemiológica das cepas envolvidas em surtos e a diferenciação entre aquelas pertencentes a um mesmo sorovar é muito importante, visto que permite análises conforme a origem, o ano e a fonte de isolamento (LAGATOLLA *et al.*, 1996; CASTELANI; DUARTE, 2011). A caracterização e a diferenciação podem ser feitas através de métodos fenotípicos, avaliando-se as características expressas pelo microrganismo, ou moleculares, analisando-se diretamente o DNA cromossômico ou extracomossômico (HELMUTH; SCHROETER, 1994; FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007). Quanto mais métodos de tipificação forem empregados concomitantemente, maior será a confiança para a determinação da origem clonal do microrganismo (OLSEN *et al.*, 1994).

Os métodos fenotípicos clássicos incluem a determinação do perfil bioquímico, o perfil de resistência antimicrobiana, a sorotipificação e a fagotipagem. Apesar de serem bastante úteis, as estratégias tradicionais de epidemiologia baseadas na análise fenotípica são limitadas (OLIVEIRA *et al.*, 2007a; OLIVEIRA *et al.*, 2007b). As ferramentas moleculares de caracterização e de diferenciação permitem a observação de pequenas variações entre as cepas de diferentes sorovares, fontes ou anos de isolamento, mas também entre aquelas de um mesmo sorovar (LAGATOLLA *et. al.*, 1996). Entre as técnicas disponíveis para tipificar as cepas de *Salmonella* spp. estão: variações da reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em campo pulsado (*Pulsed-field Gel Electrophoresis* – PFGE), ribotipificação, PCR em tempo real (*Real Time PCR* - qPCR), ribotipificação por PCR (*PCR-Ribotyping*), multiplex PCR (mPCR), microarranjos, polimorfismo no comprimento de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - AFLP), análise do polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – RFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random Amplified Polymorphic DNA* – RAPD), perfil de plasmídeos, perfil determinado por sequências de inserção, análise por enzimas de restrição (*Restriction Enzyme Analysis* - REA), PCR baseada em sequências repetitivas intergênicas em enterobactérias (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – ERIC) e sequenciamento de porções do DNA bacteriano (AHMED *et al.*, 2000; GÜRTLER; MAYALL, 2001, ANTONINI; MENEGHIN; URASHIMA, 2004; BETANCOR *et al.*, 2004; RIBOT *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2009; BAKKER *et al.*, 2011).

3.8.1 Diferenciação através da ribotipificação por reação em cadeia da polimerase e do sequenciamento

Métodos como a ribotipificação clássica, a hibridização e o DNA *fingerprinting* podem auxiliar na discriminação de cepas de *Salmonella* spp., além de oferecer informações epidemiológicas importantes, especialmente nos casos de surtos de salmonelose em humanos (LAGATOLLA *et al.*, 1996; LACONCHA *et al.*, 2000). Contudo, estas técnicas são complexas e requerem etapas laboriosas que não podem ser executadas em todos os laboratórios (LAGATOLLA *et al.*, 1996). Desta forma, elas têm sido substituídas cada vez mais pela ribotipificação por PCR, uma vez que é uma técnica mais rápida e bastante eficaz (LAGATOLLA *et al.*, 1996; GEIMBA, 2005; OLIVEIRA

et al., 2009). A ribotipificação por PCR consiste na utilização de sequências iniciadoras (*primers*) para regiões altamente conservadas dos genes ribossomais 16S e 23S. Estes dois genes são separados por regiões espaçadoras que possuem polimorfismos que podem diferenciar as cepas dentro de um gênero e de uma espécie (JENSEN; WEBSTER; STRAUS, 1993). As sequências são variáveis quanto ao tamanho e à sequência de nucleotídeos, o que permite a classificação das cepas em diferentes ribotipos (PAVLIC; GRIFFITHS, 2009). A ribotipificação por PCR é um método rápido e de alta reprodutibilidade que apresenta resultados semelhantes àqueles obtidos através da eletroforese em campo pulsado (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A utilização do sequenciamento para a tipificação molecular é muito útil para estabelecer a relação entre as cepas, uma vez que é uma técnica de alta precisão para microrganismos com baixa variabilidade genética (CHRISTENSEN *et al.*, 2000), como no caso de *Salmonella*. Esta técnica é bastante útil para os estudos sobre a evolução das características de virulência e transmissão desta bactéria (WEITZMAN, 2001; BAKKER *et al.*, 2011). Estudos de sequenciamento realizados por Bakker *et al.* (2011) demonstram que os sorovares de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* podem ter evoluído a partir de ramificações que apresentam diferenças genômicas, incluindo diferentes genes de virulência, sugerindo que a forma de transmissão e a interação com o hospedeiro podem variar significativamente entre os sorovares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local de realização dos experimentos

Todas as etapas deste trabalho foram desenvolvidas no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), com exceção do sequenciamento, que foi realizado pelo laboratório ACTGene Análises Moleculares do Centro de Biotecnologia (CBiot). Ambos os centros pertencem à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.2 Cepas de *Salmonella* spp.

Foram utilizadas 243 cepas de *Salmonella* spp. isoladas na região sul do Brasil e previamente classificadas e sorotipificadas pela Fundação Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). As informações completas referentes às cepas analisadas constam no APÊNDICE A. Na Tabela 1 encontra-se a lista dos sorovares e do número de cepas analisadas pertencentes a cada um deles.

Tabela 1 – Cepas de *Salmonella* spp. selecionadas para o estudo e agrupadas conforme a classificação por sorovar.

Sorovar	Total de cepas por sorovar
S. Enteritidis	150
S. Heidelberg	49
S. Hadar	14
S. Typhimurium	8
S. Anatum	5
S. Bredeney	5
S. Agona	4
S. Tennessee	3
S. Infantis	2
S. Brandenburg	2
S. Schwarzengrund	1

As cepas utilizadas neste trabalho foram divididas em três grupos conforme a origem de isolamento. Na Tabela 2 estão descritos o número de cepas analisadas e a fonte de isolamento para cada grupo.

Tabela 2 – Origem das cepas: fonte de isolamento e número de cepas analisadas em cada grupo.

Origem das cepas	Fontes de isolamento	Total de cepas em cada grupo
Campo	- Ambiente de criação de frangos de corte e de matrizes. - Órgãos de frangos de corte e de matrizes.	84
Produto	- Carcaças inteiras de frangos de corte obtidas em matadouros-frigoríficos. - Diferentes cortes de frangos de corte obtidos em matadouros-frigoríficos.	79
Surtos	Alimentos envolvidos em casos clínicos de salmonelose em humanos.	80

Todas as cepas pertencentes aos grupos campo e produto foram selecionadas a partir da bacterioteca do CDPA. As cepas provenientes de surtos foram gentilmente cedidas pelo professor Dr. Eduardo César Tondo do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

4.3 Reativação e confirmação da pureza das cepas

As cepas encontravam-se estocadas a -80ºC em caldo cérebro-coração (*Brain-Heart Infusion Broth* – BHI – Oxoid; Cambridge, Reino Unido) com 20% de glicerol. A reativação foi feita através da inoculação de uma alíquota do material em caldo BHI e incubação a 37ºC por 24 horas. Posteriormente foi feito o isolamento em ágar desoxicolato-lisina-xilose (Xylose Lysine Deoxycholate – XLD – Oxoid; Cambridge, Reino Unido) para confirmação da pureza das cepas. A partir das colônias isoladas no ágar XLD, foi preparado um novo estoque, mantido até o momento de utilização das cepas.

4.4 Análises estatísticas

Os programas Microsoft Excel (Microsoft; Redmond, EUA), Statistica (Dell; São Paulo, Brasil) e PASW Statistics (IBM; Hong Kong) foram utilizados para a análise estatística dos dados. Foi adotado como referencial para as análises um nível de significância de 5%.

- A estatística descritiva foi utilizada para a determinação das frequências absolutas e relativas do grau de produção de biofilme, da resistência antimicrobiana fenotípica, dos genes de virulência e de resistência antimicrobiana, da fagotipagem e da classificação em ribotipos.
- A Análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para avaliação da produção de biofilme entre os diferentes sorovares.
- O teste t de Student foi utilizado para análise da produção de biofilme entre as cepas isoladas de fontes avícolas e de surtos em humanos. O teste t também foi utilizado para determinar a relação entre a produção de biofilme e a resistência antimicrobiana, e a relação entre a produção de biofilme e a presença dos genes de virulência.
- Os testes não paramétricos de Qui-quadrado (χ^2) e de Fisher foram utilizados para análise da suscetibilidade das cepas entre os diferentes antimicrobianos testados, para a comparação da resistência entre os sorovares e entre as origens de isolamento para cada antimicrobiano. Estes mesmos testes também foram utilizados para a análise da presença dos genes de virulência entre sorovares e entre as fontes de isolamento da cepa.
- A análise discriminante foi empregada para a obtenção das árvores de decisão, utilizadas para identificar possíveis genes marcadores dos sorovares e das fontes de isolamento.
- O teste McNemar foi utilizado para a comparação da frequência dos genes associados à virulência dentro de grupos separados por função.

5 EXPERIMENTOS

5.1 Experimento I - Avaliação da capacidade de formação de biofilmes

5.1.1 Materiais e Métodos

As cepas foram avaliadas quanto à capacidade de formação de biofilmes através da inoculação em placas de poliestireno submetidas a diferentes temperaturas de incubação: 37ºC, 28ºC, 12ºC e 3ºC. A metodologia foi adaptada a partir dos trabalhos de Stepanović *et al*. (2000) e de Silva *et al.* (2014).

5.1.1.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes a 37ºC

A reativação das cepas foi feita através da semeadura em ágar tripticase de soja sem glicose (*Trypticase Soy Agar* – TSA – Merck; Darmstadt, Alemanha) e incubação a 37°C por 18-24 horas. Posteriormente foi realizada a inoculação do material em caldo tripticase de soja sem glicose (T*rypticase Soy Broth* – TSB – Difco Laboratories; Michigan, EUA) seguida de incubação a 37ºC por 18-24 horas. Após, foi feita a diluição do caldo TSB cultivado em caldo TSB não inoculado até se obter a concentração correspondente a 1 na escala nefelométrica de Mc Farland (Probac do Brasil; São Paulo, Brasil), a qual indica uma concentração de aproximadamente $3x10^8$ UFC/mL. A partir da suspensão bacteriana obtida foram adicionados 200µL a microplacas estéreis de poliestireno com fundo chato (Kasvi; Curitiba, Brasil) em triplicata. O controle negativo de cada placa foi o caldo TSB não inoculado, também adicionado em triplicata. Para controle interno dos testes foi utilizada uma cepa padrão de *S.* Enteritidis (ATCC 13076) e uma cepa de *S.* Enteritidis da bacterioteca do CDPA, previamente classificada como fortemente produtora. As cepas foram submetidas à incubação a 37ºC (±1ºC) por 18-24 horas. Após o período de incubação, a suspensão bacteriana de cada poço foi aspirada e descartada. A placa foi lavada três vezes com 250µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% para remoção das células planctônicas e daquelas que estavam na fase de adesão reversível. As células bacterianas aderidas foram fixadas com 200µL de metanol por 15 minutos. O mesmo foi removido, e as placas foram secas à temperatura ambiente e coradas com 200µL de solução cristal violeta de Hucker a 2% por cinco minutos. Após, as placas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Antes da leitura, adicionou-se 200µL de ácido acético glacial a 33% em todos os poços. A medida

da densidade óptica foi realizada em leitor de ELISA (Biotek; Winooski, EUA), utilizando-se um filtro de 550nm.

A densidade óptica de cada cepa (OD) foi obtida pela média aritmética do valor dos três poços. O ponto de corte (OD_C) foi definido como o valor correspondente a três desvios-padrão acima da média aritmética dos valores dos três poços do controle negativo não inoculado. Para determinar a capacidade de formação de biofilme das cepas, foram utilizados os seguintes critérios de classificação: não produtora ($OD \leq OD_C$), fracamente produtora ($OD_C < OD \leq 2x\ OD_C$), moderadamente produtora ($2x\ OD_C < OD \leq x\ OD_C$) ou fortemente produtora ($4x\ OD_C < OD$).

5.1.1.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes a 28ºC, 12ºC e 3ºC

As cepas classificadas como fortemente produtoras ou como não produtoras de biofilmes a 37ºC na etapa anterior foram selecionadas para a avaliação em outras temperaturas. O procedimento descrito anteriormente foi repetido, modificando-se apenas a temperatura de incubação das placas para 28ºC, temperatura ideal para produção de biofilme por alguns sorovares de *Salmonella* spp. (PIRAS *et al.*, 2015); 12ºC, temperatura média da sala de cortes dos matadouros-frigoríficos (BRASIL, 1998); e 3ºC, temperatura média ideal de um refrigerador doméstico (SILVA; CELIDONIO; OLIVEIRA, 2008).

5.1.2 Resultados e discussão

5.1.2.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes a 37ºC

A técnica adaptada permitiu a detecção de cepas de *Salmonella* spp. produtoras de biofilme em diferentes graus. O uso do caldo TSB e do ágar TSA, ambos sem glicose, favoreceu a formação de biofilmes *in vitro*. Estes meios são pobres em nutrientes, condição que favorece a produção de biofilmes (RODRIGUES *et al.*, 2009; AGARWALL *et al.*, 2011). As placas de poliestireno utilizadas para o experimento *in vitro* mimetizam alguns dos materiais plásticos utilizados em plantas de processamento de alimentos e apresenta uma boa repetibilidade para o objetivo proposto (PIRAS *et al.*, 2015).

Alguns autores sugerem que existe uma relação dos resultados de classificação dos estudos *in vitro*, utilizando-se placas de poliestireno e meios pobres em nutrientes, com a formação de biofilme por *Salmonella* spp. no ambiente de produção (VESTBY *et al.*, 2009). Mesmo que os testes em laboratório não representem exatamente a situação

real por em geral apresentarem condições mais favoráveis ao crescimento bacteriano (WANG *et al.*, 2013), este teste é considerado reprodutível e compatível com os objetivos desejados (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000; STEPANOVIĆ *et al.*, 2004; NAVES *et al.*, 2008; AGARWAL *et al.*, 2011; DÍEZ-GARCÍA; CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2012; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012).

Entre as cepas analisadas, 71,6% (174/243) produziram biofilme. Entretanto, 69,5% (121/174) destas foram classificadas como fracas, e apenas 7,5% (13/174) como fortemente produtoras de biofilme. Outros trabalhos também já haviam detectado cepas de *Salmonella* spp. capazes de produzir biofilmes em placas de poliestireno. Entretanto, o grau de formação destas estruturas é variável entre os trabalhos publicados (STEPANOVIĆ *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009; TONDO *et al.*, 2010; AGARWAL *et al.*, 2011; SCHONEWILLE *et al.*, 2012; STEENACKERS *et al.*, 2012; TURKI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014). É possível que a grande ocorrência de cepas produtoras de biofilmes em placas de poliestireno seja devido a maior capacidade de *Salmonella* spp. em se aderir às superfícies hidrofóbicas, como o poliestireno, em relação às hidrofílicas, como o vidro e o aço inoxidável, conforme demonstrado em trabalhos anteriores (RODRIGUES *et al.*, 2009; TONDO *et al.*, 2010; STEENACKERS *et al.*, 2012). Sugere-se em trabalhos futuros o estudo da produção de biofilme por *Salmonella* spp. em diferentes superfícies de contato, como metais e vidros, uma vez que são bastante utilizados na indústria alimentícia e nas residências dos consumidores, respectivamente.

Os resultados encontrados são de especial importância, pois os materiais contendo plástico são muito utilizados no ambiente de criação dos animais, nos matadouros-frigoríficos, nas indústrias de processamento de alimentos e nas residências dos consumidores (DÍEZ-GARCÍA; CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2012; STEENACKERS *et al.*, 2012). Além disto, trabalhos anteriores demonstram que mesmo em pequenos intervalos de tempo de contato da bactéria com a superfície já é possível ocorrer a formação de biofilmes (TONDO *et al.*, 2010).

Cepas que apresentam maior capacidade de produzir biofilmes apresentam um risco elevado de persistirem por um maior tempo nas plantas industriais (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012), uma vez que podem ser até 1.000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos e aos desinfetantes de uso comum do que as bactérias planctônicas (WANG *et al.*, 2016). Estudos anteriores já demonstraram que os desinfetantes comuns não são capazes de eliminar os biofilmes, mesmo após mais de 90 minutos de ação dos

compostos (CORCORAN *et al.*, 2014). Desta forma, testes para avaliar a eficácia de desinfetantes em superfícies contendo biofilme também podem oferecer importantes contribuições em estudos futuros.

Ainda não está elucidada a influência do sorovar na capacidade de produção de biofilme por cepas de *Salmonella* spp. e são poucos os estudos que comparam as diferenças entre eles. Alguns autores afirmam que as características específicas de cada sorovar podem conferir às cepas uma maior ou menor habilidade em produzir biofilmes (VESTBY *et al.*, 2009; DÍEZ-GARCÍA; CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2012; SCHONEWILLE *et al.*, 2012; CASTELIJN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013). Entretanto, é possível que a variabilidade das cepas dentro de um mesmo sorovar seja muito grande, o que não permitiria relacioná-lo com a capacidade de produção de biofilmes (AGARWAL *et al.*, 2011; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012).

Neste trabalho foi realizada a comparação da capacidade de produzir biofilme entre distintos sorovares. As frequências absoluta e relativa da classificação das cepas conforme a produção de biofilme em cada sorovar estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Classificação das 243 cepas de *Salmonella* spp. de diferentes sorovares conforme a capacidade de produção de biofilme a 37ºC.

Sorovar	Classificação conforme a produção de biofilme - % (n/N)				Total de cepas produtoras % (n/N)
	Não produtora	Fracamente produtora	Moderadamente produtora	Fortemente produtora	
S. Enteritidis	28 (42/150)	44 (66/150)	20,7 (31/150)	7,3 (11/150)	72 (108/150)
S. Heidelberg	42,9 (21/49)	51 (25/49)	6,1 (3/49)	0 (0/49)	57,1 (28/49)
S. Hadar	14,3 (2/14)	71,5 (10/14)	7,1 (1/14)	7,1 (1/14)	85,7 (12/14)
S. Typhimurium	0 (0/8)	87,5 (7/8)	12,5 (1/8)	0 (0/8)	100 (8/8)
S. Anatum	20 (1/5)	40 (2/5)	20 (1/5)	20 (1/5)	80 (4/5)
S. Bredeney	20 (1/5)	60 (3/5)	20 (1/5)	0 (0/5)	80 (4/5)
S. Agona	25 (1/4)	75 (3/4)	0 (0/4)	0 (0/4)	75 (3/4)
S. Tennessee	33,3 (1/3)	66,7 (2/3)	0 (0/3)	0 (0/3)	66,7 (2/3)
S. Infantis	0 (0/2)	100 (2/2)	0 (0/2)	0 (0/2)	100 (2/2)
S. Brandenburg	0 (0/2)	0 (0/2)	100 (2/2)	0 (0/2)	100 (2/2)
S. Schwarzengrund	0 (0/1)	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/1)	100 (1/1)

Observou-se diferença significativa na capacidade de produção de biofilme entre os sorovares *S.* Heidelberg e *S.* Enteritidis e entre *S.* Heidelberg e *S.* Anatum, conforme indicado na Tabela 4. Para a análise estatística foram excluídos aqueles sorovares com menos de quatro cepas (*S.* Tennessee, *S.* Infantis, *S.* Brandenburg e *S.* Schwarzengrund).

Tabela 4 – Comparação dos sorovares aos pares conforme a capacidade de produção de biofilme a 37ºC.

Sorovar	*S.* Heidelberg	*S.* Typhimurium	*S.* Enteritidis	*S.* Anatum	*S.* Bredeney	*S.* Hadar
S. Typhimurium	0,112					
S. Enteritidis	**0,001***	0,860				
S. Anatum	**0,045***	0,552	0,376			
S. Bredeney	0,335	0,787	0,842	0,435		
S. Hadar	0,075	0,881	0,993	0,437	0,866	
S. Agona	0,781	0,450	0,431	0,232	0,646	0,484

*Valores em negrito indicam diferença significativa ($p<0,05$).

Entre as cepas de *S.* Enteritidis analisadas, 72% (108/150) produziram biofilme. Dentro deste grupo, é importante destacar que 38,9% (42/108) foram moderada ou fortemente capazes de produzir estas estruturas. *S.* Enteritidis é um dos mais importantes sorovares em saúde pública, uma vez que está frequentemente envolvido em surtos de salmonelose em humanos (BRASIL, 2008). A alta frequência pode ser uma consequência da capacidade e da propensão que algumas cepas de *S.* Enteritidis têm em se aderirem e formarem biofilmes em diversas superfícies (CABARKAPA *et al.*, 2015). Alguns autores, inclusive, destacam este sorovar como o maior produtor de biofilmes (SCHONEWILLE *et al.*, 2012). Trabalhos anteriores indicam resultados similares quanto à capacidade de formação de biofilme por cepas deste sorovar. Em 2013, 89,4% das cepas avaliadas por Puffal (2013) apresentaram algum grau de aderência, sendo que 34% destas foram fortemente produtoras de biofilme. Entre as cepas de *S.* Enteritidis analisadas por Silva *et al.* (2014), 98% produziram biofilme, sendo 22,2% fortemente produtoras e 33,3% moderadamente produtoras de biofilme. Contudo, segundo Cabarkapa *et al.* (2015), a capacidade de produção de biofilme das cepas de *S.* Enteritidis é reduzida quando a incubação é feita a 37ºC, uma vez que muitos componentes da matriz extracelular somente são produzidos em temperaturas inferiores a 30ºC. No experimento realizado por estes autores, nenhuma cepa foi classificada como fortemente produtora quando a temperatura de incubação foi de 37ºC. É possível que parte das cepas fracamente produtoras de biofilme no presente estudo se tornem moderadamente ou fortemente

produtoras de biofilme quando a temperatura de incubação é reduzida a 30ºC ou menos. Entretanto, esta hipótese ainda precisa ser provada em estudos futuros.

Em relação ao sorovar *S.* Heidelberg, nenhuma cepa foi classificada como fortemente formadora de biofilme, mas 57,1% (28/49) produziram, de forma fraca ou moderada, estas estruturas. A habilidade das cepas pertencentes a este sorovar em formar biofilmes é um dado preocupante, pois além de o isolamento de *S.* Heidelberg ter aumentado consideravelmente nos últimos anos (ANDREATTI, 2014), este sorovar também está relacionando com surtos de salmonelose em humanos por cepas altamente resistentes a antimicrobianos (PATCHANEE *et al.*, 2008; CDC, 2015). Em relação ao sorovar *S.* Hadar, 85,7% (12/14) das cepas apresentaram a capacidade de formar biofilme, mas apenas uma foi classificada como fortemente produtora de biofilme. Outros autores consideram o mesmo sorovar como um fraco produtor de biofilme (MARIN; HERNANDIZ; LAINEZ, 2009).

Todas as cepas de *S.* Typhimurium foram capazes de produzir biofilme, mas 87,5% (7/8) de forma fraca. Nenhuma cepa deste sorovar foi classificada como fortemente produtora de biofilme a 37ºC. Vestby *et al.* (2009) e Castelijn *et al.* (2013) também encontraram resultados semelhantes. Entretanto, os meios de cultura utilizados não foram os mesmos do presente trabalho. Estudos anteriores observaram que as cepas de *S.* Typhimurium produziram mais biofilme em aço inoxidável do que em superfícies acrílicas (material termoplástico rígido) (NGUYEN; YANG; YUK, 2014), o que poderia explicar a baixa adesão à superfície de poliestireno. É provável que a baixa capacidade de *S.* Typhimurium em se aderir fortemente à superfície de poliestireno seja a razão para este sorovar não ser detectado com maior frequência nas plantas das indústrias alimentícias e não ser considerado um sorovar persistente no ambiente (VESTBY *et al.*, 2009).

Três cepas de *S.* Agona foram capazes de formar biofilme, mas todas classificadas como fracamente produtoras. Diferentemente do que foi observado no estudo, alguns autores já descreveram uma tendência do sorovar *S.* Agona ser fortemente produtor de biofilmes (VESTBY *et al.*, 2009; DÍEZ-GARCÍA; CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2012; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012; CORCORAN *et al.*, 2013). Esta tendência pode estar relacionada com a maior capacidade de sobrevivência destas cepas no ambiente de produção de alimentos (NESSE *et al.*, 2003; VESTBY *et al.*, 2009; DÍEZ-GARCÍA; CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2012).

Todas as cepas de *S.* Infantis foram classificadas como fracamente produtoras de biofilme. Schonewille *et al.* (2012) e Castelijn *et al.* (2013) também detectaram cepas de *S.* Infantis com fraca capacidade de formação destas estruturas. Apesar de ser considerado um sorovar muito frequente na União Europeia (ECDC, 2015a), acredita-se que a sua manutenção nas criações comerciais não seja devida à formação de biofilmes (SCHONEWILLE *et al.*, 2012).

São raros os trabalhos que avaliam a capacidade de formação de biofilme por cepas de *Salmonella* pertencentes ao sorovares *S.* Tennessee, *S.* Brandenburg, *S.* Bredeney, *S.* Anatum e *S.* Schwarzengrund. Devido ao baixo número de cepas pertencentes a estes sorovares, os dados obtidos neste estudo não podem ser generalizados ou extrapolados para cepas não avaliadas. Observou-se que a maior parte das cepas destes sorovares apresentou uma baixa capacidade de produzir biofilme. Estes dados foram semelhantes àqueles encontrados por Agarwal *et al.* (2011) e por Castelijn *et al.* (2013). Entretanto, estes autores também estudaram poucos exemplares destes sorovares e pequenas diferenças entre os trabalhos devem ser decorrentes do menor tamanho amostral. Sugere-se a inclusão de um maior número de cepas destes sorovares em estudos futuros para que seja possível uma análise generalizada dos dados e uma melhor comparação da habilidade de cada sorovar em produzir biofilmes. Neste contexto, destaca-se especialmente o sorovar *S.* Infantis, devido a sua alta prevalência na União Europeia. Da mesma forma, a inclusão de outros sorovares de interesse também pode ser uma ferramenta útil.

Estudos genéticos utilizando PFGE demonstraram que os sorovares que possuem maior capacidade de produzir biofilmes e que, por esta razão, persistem por mais tempo no ambiente, tendem a apresentar uma baixa variabilidade genética. Consequentemente, estes sorovares possuem uma origem clonal mais limitada. Já aqueles que em geral não são fortes produtores de biofilme e que são menos isolados nos ambientes de produção tendem a apresentar uma maior variabilidade genética (NESSE *et al.*, 2003; VESTBY *et al.*, 2009; SCHONEWILLE *et al.*, 2012).

Foi realizada a comparação entre as cepas *S.* Enteritidis e entre as cepas de *S.* Heidelberg para analisar se existe diferença significativa no número de cepas classificadas em cada grau de produção de biofilme dentro de um mesmo sorovar. Devido ao menor número de cepas, os demais sorovares não foram analisados. Observou-se diferença significativa ($p<0,05$) entre as classificações dentro dos dois sorovares, assim como descrito previamente na literatura (CASTELIJN *et al.*, 2013). Este resultado

demonstra que mesmo dentro de um sorovar existem variações importantes quanto à habilidade em produzir biofilme. Estas diferenças podem estar relacionadas com características intrínsecas das cepas, como a presença de genes associados à produção de biofilme.

Não está totalmente estabelecido se a origem de isolamento influencia na habilidade das cepas em produzir biofilmes. Neste trabalho também foi realizada a comparação da capacidade de produzir biofilme entre as cepas de diferentes origens. Na Tabela 5 está descrita a frequência relativa considerando-se as três origens de isolamento das cepas. Na Tabela 6 está descrita a frequência relativa considerando-se campo e produto como uma única fonte de isolamento (fontes avícolas).

Tabela 5 – Classificação das 150 cepas de *S.* Enteritidis considerando-se três origens de isolamento (campo, produto e surtos) conforme a capacidade de produção de biofilme a 37ºC.

Origem de isolamento da cepa	Classificação conforme a produção de biofilme - % (n/N)			
	Não produtora	Fracamente produtora	Moderadamente produtora	Fortemente produtora
Campo	38 (19/50)	30 (15/50)	22 (11/50)	10 (5/50)
Produto	10 (2/20)	40 (8/20)	30 (6/20)	20 (4/20)
Surtos	26,2 (21/80)	53,8 (43/80)	17,5 (14/80)	2,5 (2/80)

Tabela 6 – Classificação das 150 cepas de *S.* Enteritidis considerando-se duas origens de isolamento (fontes avícolas e surtos) conforme a capacidade de produção de biofilme a 37ºC.

Origem de isolamento da cepa	Classificação conforme a produção de biofilme - % (n/N)			
	Não produtora	Fracamente produtora	Moderadamente produtora	Fortemente produtora
Fontes avícolas	30 (21/70)	32,9 (23/70)	24,3 (17/70)	12,8 (9/70)
Surtos	26,2 (21/80)	53,8 (43/80)	17,5 (14/80)	2,5 (2/80)

Comparando-se as cepas isoladas de fontes avícolas (campo e produto) e aquelas isoladas de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose não foram constatadas diferenças significativas ($p>0,05$) quanto ao grau de produção de biofilme, mesmo que um maior número de cepas de surtos tenha sido capaz de produzir biofilme, quando comparado às cepas provenientes de fontes avícolas. Outros autores também não observaram diferença significativa na capacidade de produção de biofilmes entre cepas

de diferentes origens (SOLOMON *et al.*, 2005; AGARWAL *et al.*, 2011; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012; PIRAS *et al.*, 2015). Apenas o trabalho de Castelijn *et al.* (2012) descreve uma maior produção de biofilme em cepas isoladas de surtos e de produtos, quando comparado àquelas isoladas do ambiente industrial. Apesar de não ter encontrado diferença significativa entre as origens de isolamento, Piras *et al.* (2015) destacam que cepas originadas de um mesmo clone e isoladas de diferentes fontes, podem apresentar comportamentos distintos na produção de biofilme. Em um estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2011), todas as cepas de *S.* Enteritidis isoladas de humanos foram produtoras de biofilme, demonstrando a alta capacidade de produção destas estruturas. Entretanto, tanto no trabalho de Rodrigues *et al.* (2011) como no presente estudo, a maioria das cepas envolvidas em surtos de salmonelose foi classificada como fracamente produtora, enquanto que a maior parte daquelas de origem aviária foi moderada ou fortemente produtora.

5.1.1.2 Avaliação da capacidade de formação de biofilmes a 28ºC, 12ºC e 3ºC

Todas as cepas fortemente produtoras e todas as não produtoras de biofilme a 37ºC foram selecionadas para os testes frente às temperaturas de incubação de 28ºC, 12ºC e 3ºC. No total foram testadas 13 cepas fortemente produtoras (onze de *S.* Enteritidis, uma de *S.* Hadar e uma de *S.* Anatum) e 69 cepas não produtoras (42 de *S.* Enteritidis, 21 de *S.* Heidelberg, duas de *S.* Hadar, uma de *S.* Agona, uma de *S.* Anatum, uma de *S.* Bredeney e uma de *S.* Tennessee) de biofilme.

Em todas as temperaturas foram observadas cepas produtoras de biofilme. Nos Gráfico 1 e 2 estão representadas, respectivamente, as classificações das cepas fortemente produtoras e das cepas não produtoras de biofilmes a 37ºC, quando incubadas a 28ºC, 12ºC e 3ºC.

Gráfico 1 – Comportamento das 13 cepas de *Salmonella* spp. classificadas como fortemente produtoras de biofilmes a 37ºC quando incubadas a 28ºC, 12ºC e 3ºC.

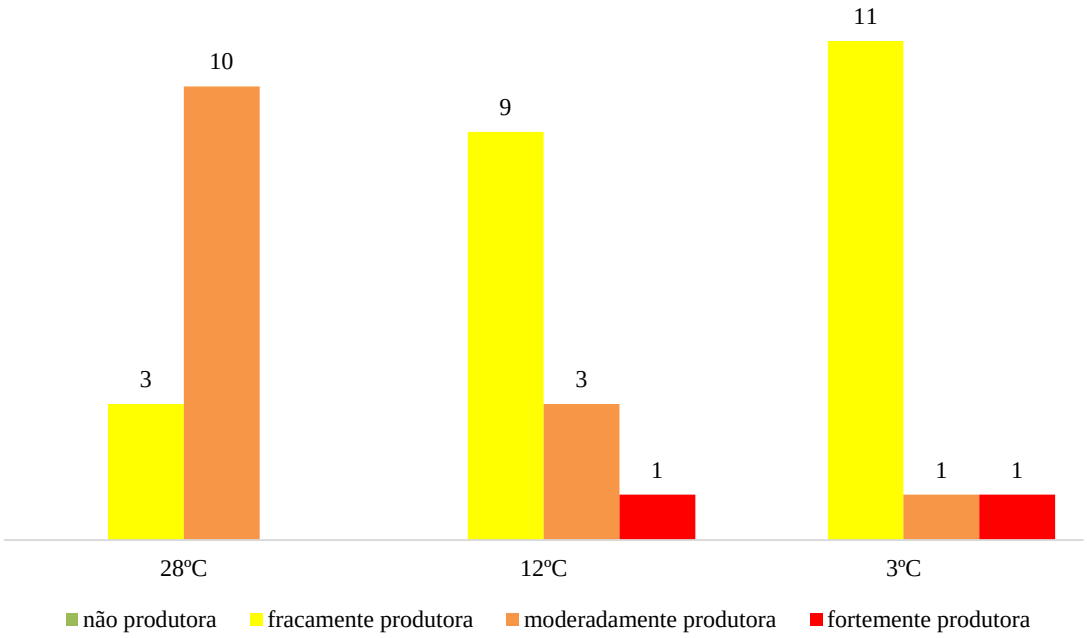
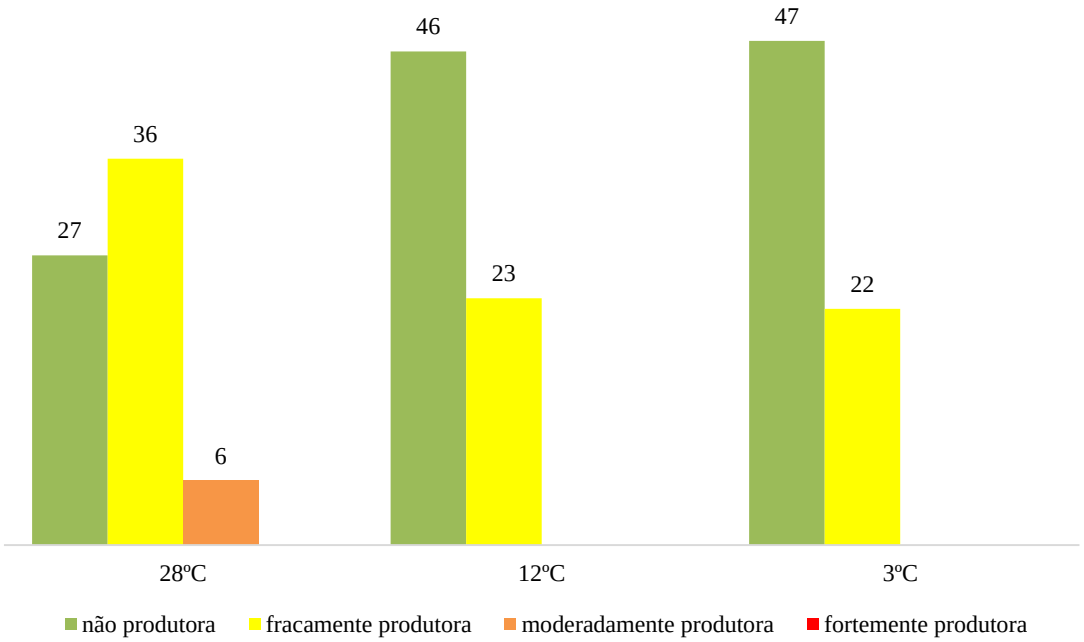


Gráfico 2 – Comportamento das 69 cepas de *Salmonella* spp. classificadas como não produtoras de biofilmes a 37ºC quando incubadas a 28ºC, 12ºC e 3ºC.



Analisando-se o comportamento das cepas classificadas como fortemente produtoras a 37ºC, quando incubadas em outras temperaturas, observa-se que o número

de cepas classificadas como fortes diminuiu nas três novas temperaturas avaliadas. Entretanto, todas as cepas continuaram a produzir biofilme. Quando se avalia o comportamento das cepas classificadas como não produtoras a 37ºC em outras temperaturas, percebe-se que o número de cepas não produtoras diminuiu. Logo, as cepas que anteriormente não eram capazes de formar biofilmes adquiriram esta capacidade nas três temperaturas de incubação avaliadas.

O processo de formação de biofilmes pelos microrganismos é influenciado por vários fatores ambientais, como o pH e a concentração de nutrientes no meio. Já foi demonstrado que a temperatura é um dos mais importantes (STEPANOVIĆ *et al.*, 2003; AGARWAL *et al.*, 2009; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014; CABARKAPA *et al.*, 2015; PIRAS *et al.*, 2015). A diminuição da temperatura de incubação pode reduzir o crescimento bacteriano, mas também pode favorecer a produção de biofilmes, uma vez que as cepas são capazes de expressar componentes que não seriam produzidos em outras condições (STEPANOVIĆ *et al.*, 2003; AGARWAL *et al.*, 2011; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012; SCHONEWILLE *et al.*, 2012). A produção de curli e de celulose, por exemplo, só ocorre em temperaturas inferiores a 30ºC, especialmente entre 25ºC e 28ºC (GERSTEL; ROMLING, 2001; XU *et al.*, 2010; OLIVEIRA, 2011; CABARKAPA *et al.*, 2015; PIRAS *et al.*, 2015). Esta característica poderia explicar o fato de que algumas cepas não produtoras a 37ºC terem sido capazes de produzir biofilme a 28ºC. Stepanović *et al.* (2003) observaram maior produção de biofilme a 30ºC do que a 37ºC. Da mesma forma, Piras *et al.* (2015) relatam uma maior produção de biofilme a 22ºC do que a 35ºC. Estas variações indicam que os fatores que auxiliam na produção de biofilme se comportam de forma diferente, conforme a temperatura de incubação (CABARKAPA *et al.*, 2015).

Para melhor caracterizar o comportamento das cepas a 28ºC, 12ºC e 3ºC, sugere-se, futuramente, a avaliação da capacidade de produção de biofilme de todas as cepas classificadas como fracamente ou moderadamente produtoras a 37ºC no estudo. A realização de estudos em outras temperaturas de incubação, como a 30ºC e a 25ºC, por exemplo, também é interessante. Além disto, testes fenotípicos para determinar o morfotipo das cepas e avaliar a produção de curli e de celulose nas diferentes temperaturas de incubação também devem ser realizados em estudos futuros no laboratório.

Os dados referentes à habilidade de algumas cepas de *Salmonella* spp. em produzir biofilmes a 12ºC devem servir de alerta para as indústrias processadoras de alimentos, especialmente os matadouros-frigoríficos de aves, uma vez que esta é a temperatura

média da sala de cortes destes estabelecimentos (BRASIL, 1998). Utensílios, equipamentos e estruturas podem se tornar fontes propícias ao acúmulo de substratos quando não bem higienizados e, consequentemente, à produção de biofilme. Também é importante destacar a capacidade de *Salmonella* spp. em formar biofilme a 3ºC, temperatura média do refrigerador doméstico (SILVA; CELIDONIO; OLIVEIRA, 2008), uma vez que a maior parte dos surtos de DTA ocorrem nas residências dos consumidores devido à manutenção dos alimentos em temperaturas incorretas (BRASIL, 2015c). A capacidade de crescimento e de produção de biofilme em temperaturas mais baixas favorece a persistência das cepas no ambiente, como em plantas de processamento de alimentos e em matadouros-frigoríficos (PIRAS *et al.*, 2015).

Não se observou um padrão de comportamento das cepas quando incubadas a 28ºC, 12ºC e 3ºC, o que pode ser explicado pelas características intrínsecas das mesmas. Segundo Agarwal *et al.* (2011), as características próprias de cada cepa, como a presença de fímbrias, flagelos, proteínas de membranas e outros apêndices celulares são mais importantes do que as características ambientais para a produção de biofilme. Por estas razões, a pesquisa de genes de virulência associados especificamente à produção de biofilme constitui um passo futuro importante no estudo da habilidade das cepas de *Salmonella* spp. em produzir estas estruturas. Outros estudos a serem realizados incluem os testes com biofilmes multiespécies, uma vez que a formação de biofilme por cepas de *Salmonella* spp. favorece a adesão de outros microrganismos, inclusive daqueles que normalmente não produzem biofilmes. Também se sugerem experimentos que comparem a capacidade de produção de biofilme das cepas de *Salmonella* spp. em diferentes temperaturas com índices de patogenicidade *in vivo* previamente estabelecidos por Lima (2014) em nosso laboratório.

5.2 Experimento II – Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana

5.2.1 Materiais e Métodos

5.2.1.1 Determinação do perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana

Todas as cepas foram testadas através do método de disco difusão em ágar frente a dez antimicrobianos: amoxicilina (10µg), ceftiofur (30µg), ciprofloxacina (30µg), cloranfenicol (30µg), espectinomicina (100µg), enfloxacina (5µg), gentamicina (10µg), tetraciclina (30µg), sulfafurazol (300µg) e sulfametoxazol associado ao trimetoprim (1,25µg/23,75µg). A metodologia utilizada foi aquela descrita na norma VET01-A4 do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (*Clinical & Laboratory Standards Institute* – CLSI) (CLSI, 2014a).

A reativação das cepas foi realizada em caldo BHI, seguida de semeadura em ágar cérebro coração (*Brain-Heart Agar* – BHA – Oxoid; Cambridge, Reino Unido) e posterior incubação a 37ºC por 18-24 horas. Colônias isoladas foram selecionadas e inoculadas em 5mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% para se obter a concentração correspondente a 0,5 na escala nefelométrica de Mc Farland (aproximadamente $1,5x10^8$ UFC/mL). 100µL desta solução foram adicionados a placas contendo ágar Müeller-Hinton (Oxoid; Cambridge, Reino Unido) e homogeneizados com auxílio de uma alça de Drigalski. Os discos antimicrobianos (Oxoid; Cambridge, Reino Unido) foram adicionados, e as placas incubadas a 37ºC por 18-24 horas. A cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922) foi utilizada como controle interno de qualidade do teste. A leitura das placas foi feita através da mensuração do halo de inibição. As cepas foram classificadas como suscetíveis, parcialmente suscetíveis (intermediárias) ou resistentes, conforme os padrões estabelecidos pelas normas VET01-S2 (CLSI, 2014b) e M100-S23 (CLSI, 2013). As cepas que apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano de três ou mais classes farmacológicas foram classificadas como multirresistentes, conforme Schwarz *et al.* (2010) e Magiorakos *et al.* (2012).

5.2.1.2 Determinação do perfil genotípico de resistência antimicrobiana

As cepas classificadas como multirresistentes no teste fenotípico foram selecionadas para a determinação do perfil genotípico de resistência através da pesquisa de 12 genes associados à resistência para β-lactâmicos (bla_{PSE-1}, bla_{TEM}), tetracilinas

(*tet*(A), *tet*(B), *tet*(G)), anfenicois (*floR, cmlA*), aminoglicosídeos (*strA, strB, aadA*) e sulfonamidas (*sul1* e *sul2*).

A extração do DNA foi realizada através de tratamento térmico, adaptado a partir da técnica descrita por Borsoi *et al.* (2009). Para este procedimento, utilizou-se 1mL do BHI cultivado *overnight*. O material foi centrifugado a 8.000g por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 800µL de água ultrapura para realizar a lavagem do material. As amostras foram centrifugadas novamente a 8.000g por mais 5 minutos. Este procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida adicionou-se 200µL de água ultrapura e se homogeneizou o material em um agitador de tubos. O material foi submetido a uma incubação em banho-maria a 100ºC por 10 minutos seguido de uma centrifugação a 8.000g por 1 minuto. O sobrenadante contendo o DNA foi separado e armazenado a -20°C até o momento da análise.

Na Tabela 7 estão descritos a sequência dos *primers*, o tamanho do amplicons e os controles positivos utilizados para cada protocolo.

Tabela 7 – Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana através da técnica de PCR: sequência dos *primers*, tamanho do amplicon e cepa selecionada como controle positivo para cada protocolo.

Gene	Sequência dos *primers*	Amplicon (pb)	Controle positivo
$bla_{\text{PSE-1}}$	F - TTTGGTTCCGCGCTATCTG R - TACTCCGAGCACCAAATCCG	132	*S.* Typhimurium var. Copenhagen 13
bla_{TEM}	F - GCACGAGTGGGTTACATCGA R - GGTCCTCCGATCGTTGTCAG	291	*S.* Typhimurium var. Copenhagen 15
tet(A)	F - GGCCTCAATTTCCTGACG R - AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	372	*S.* Bredeney 108
tet(B)	F - GAGACGCAATCGAATTCGG R - TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC	228	*S.* Bredeney 108
tet(G)	F - CAGCTTTCGGATTCTTACGG R - GATTGGTGAGGCTCGTTAGC	844	*S.* Typhimurium var. Copenhagen 13
floR	F - TATCTCCCTGTCGTTCCAG R - AGAACTCGCCGATCAATG	399	*S.* Typhimurium var. Copenhagen 13
cmlA	F - CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC R - CACCTTGCCTGCCCATCATTAG	698	*S.* Typhimurium 329
strA	F - TATCTCCCTGTCGTTCCAG R - AGAACTCGCCGATCAATG	548	*S.* Typhimurium 329
strB	F - ATCGTCAAGGGATTGAAACC R - GGATCGTAGAACATATTGGC	509	*S.* Typhimurium var. Copenhagen 13
aadA	F - GTGGATGGCGGCCTGAAGCC R - AATGCCCAGTCGGCAGCG	528	*S.* Bredeney 180
sul1	F - GTGACGGTGTTCGGCATTCT R - TCCGAGAAGGTGATTGCGCT	779	*S.* Typhimurium var. Copenhagen 13
sul2	F - CGGCATCGTCAACATAACCT R - TGTGCGGATGAAGTCAGCTC	721	*S.* Bredeney 108

Legenda: *Forward* (F), *Reverse* (R), variedade (var.).

Na Tabela 8 estão descritos as concentrações dos reagentes do *mix*, as condições do termociclador e o número de ciclos de cada reação. Os protocolos foram adaptados a partir de trabalhos anteriores (CARLSON *et al.*, 1999; GUILLAUME *et al.*, 2000; KEYES *et al.*, 2000; GEBREYES; ALTIER, 2002; YANG *et al.*, 2002; LANZ; KUHNERT; BOERLIN, 2003).

Tabela 8 – Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana através da técnica de PCR: concentrações dos reagentes do *mix*, condições e número de ciclos do termociclador.

Protocolo	Concentrações dos reagentes do *mix*	Condições do termociclador	Número de ciclos
bla$_{PSE-1}$ *bla*$_{TEM}$	2,5µL Tampão 10x, 1µL dNTPs (10mM), 1µL cada primer (50pmol), 0,2µL Taq Polimerase, 2,5µL $MgCl_2$, 3µL DNA	95°C - 01min. 48°C - 30seg. 72°C - 30seg.	40
tet(A) *tet*(B) *tet*(G)	5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (10mM), 1µL cada primer (25pmol), 1µL Taq Polimerase, 2µL $MgCl_2$, 5µL DNA	94°C - 45seg. 55°C - 45seg. 72°C - 45seg.	30
floR *cmlA* *strA* *strB*	5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (10mM), 1µL cada primer (25pmol), 1µL Taq Polimerase, 2µL $MgCl_2$, 5µL DNA	94°C - 45seg. 53°C - 45seg. 72°C - 45seg.	30
aadA	5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (10mM), 1µL cada primer (25pmol), 1µL Taq Polimerase, 2µL $MgCl_2$, 5µL DNA	94°C - 45seg. 53°C - 45seg. 72°C - 45seg.	30
sul1 *sul2*	5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (10mM), 1µL cada primer (25pmol), 1µL Taq Polimerase, 2µL $MgCl_2$, 5µL DNA	94°C - 45seg. 67°C - 45seg. 72°C - 45seg.	30

5.2.2 Resultados e discussão

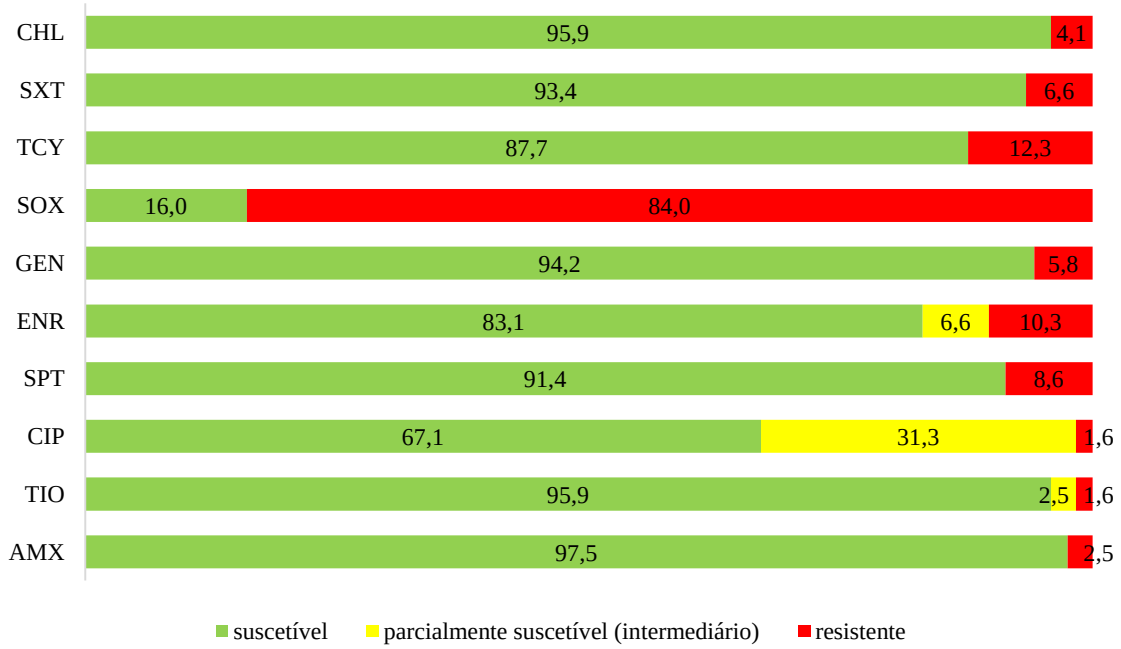
5.2.2.1 Determinação do perfil fenotípico de suscetibilidade antimicrobiana

Devido ao aumento da resistência bacteriana ao longo dos anos, são necessárias avaliações constantes da suscetibilidade dos microrganismos patogênicos responsáveis por doenças transmitidas pelos alimentos. *Salmonella* spp. é uma das bactérias consideradas prioritárias pela WHO e pela Organização Mundial da Saúde Animal (*World Organization for Animal Health* – OIE) para monitorização do surgimento de cepas resistentes em animais de produção e em seus produtos (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005). Desta forma, os testes de suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* são

importantes tanto para a escolha do antimicrobiano mais adequado para o tratamento das infecções, quanto para o monitoramento da resistência na população de *Salmonella* spp. (JORGENSEN; FERRARO, 2009). Estes testes permitem a identificação das substâncias que devem ser evitadas devido ao risco de seleção ou de indução à resistência em determinados patógenos (CLSI, 2008).

As taxas de suscetibilidade das cepas de *Salmonella* spp., independentemente da origem e do sorovar, estão apresentadas no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Suscetibilidade antimicrobiana das 243 cepas de *Salmonella* spp. frente aos dez antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar com classificação em três categorias (suscetível, intermediário e resistente).



Legenda: amoxicilina (AMX), ceftiofur (TIO), ciprofloxacina (CIP), espectinomicina (SPT), enrofloxacina (ENR), gentamicina (GEN), sulfafurazol (SOX), tetraciclina (TCY), sulfa + trimetoprim (SXT), cloranfenicol (CHL).

Neste trabalho, seis cepas foram classificadas como parcialmente suscetíveis (intermediárias) para ceftiofur, 16 para enrofloxacina e 76 para ciprofloxacina. Todos são exemplos de antimicrobianos amplamente utilizados em veterinária ou em medicina humana (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005; MACHINSKI JÚNIOR *et al*, 2005; WHO, 2011a; EFSA; ECDC, 2015). Entretanto, a utilização destes antimicrobianos em casos em que existam cepas parcialmente suscetíveis pode resultar na seleção de uma população resistente, pois estas cepas não são totalmente inibidas *in vitro* pela concentração recomendada, sendo necessário o uso de doses mais elevadas do fármaco

(CLSI, 2008; RODLOFF *et al.*, 2008; KREMPELS, 2015). Por estas razões, cepas intermediárias devem ser consideradas não susceptíveis ou resistentes (WHO, 2015).

Todas as cepas classificadas como intermediárias foram consideradas não suscetíveis e foram incluídas no grupo de cepas resistentes para a análise e discussão dos resultados obtidos, conforme determinação da WHO (WHO, 2015). As taxas de suscetibilidade das cepas de *Salmonella* spp., divididas em duas categorias (suscetível ou resistente), independentemente da origem e do sorovar, estão representadas no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Suscetibilidade antimicrobiana das 243 cepas de *Salmonella* spp. frente aos dez antimicrobianos testados através do teste de disco-difusão em ágar com classificação em duas categorias (suscetível e resistente).

Legenda: amoxicilina (AMX), ceftiofur (TIO), ciprofloxacina (CIP), espectinomicina (SPT), enrofloxacina (ENR), gentamicina (GEN), sulfafurazol (SOX), tetraciclina (TCY), sulfa + trimetoprim (SXT), cloranfenicol (CHL).

Nenhum antimicrobiano foi capaz de inibir o crescimento de 100% das cepas avaliadas, e apenas 10,7% (26/243) dos isolados apresentaram suscetibilidade aos dez fármacos. Apesar de nenhuma cepa apresentar resistência a todos os antimicrobianos testados, 89,3% (217/243) foram resistentes a pelo menos um antimicrobiano. É importante destacar que 10,7% (26/243) das cepas apresentaram resistência a mais de quatro antimicrobianos, sendo que uma cepa de *S.* Typhimurium e uma cepa de *S.* Heidelberg foram resistentes a seis fármacos. Amoxicilina, ceftiofur, cloranfenicol,

espectinomicina, gentamicina e sulfa associada ao trimetoprim foram capazes de inibir o crescimento de mais de 90% das cepas avaliadas. Por outro lado, ciprofloxacina e sulfafurazol foram, significativamente ($p<0,05$), os antimicrobianos que apresentaram o maior número de cepas resistentes.

Apenas 16% (39/243) das cepas foram suscetíveis ao sulfafurazol. A resistência às sulfonamidas é comum em animais de produção e em humanos e já foi amplamente descrita na literatura (DOUADI *et al*., 2010; WHO, 2011b; EFSA; ECDC, 2015; PROROGA *et al.*, 2015). As sulfas estão entre os antimicrobianos mais vendidos e mais utilizados em diversos países com avicultura industrial, inclusive no Brasil. As altas taxas de resistência possivelmente estão relacionadas com a ampla utilização desta classe de antimicrobiano e que resulta em um aumento da pressão seletiva de cepas resistentes (MACHINSKI JUNIOR *et al*., 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005; GRAVE; TORREN-EDO; MACKAY, 2010; WHO, 2011a; MAKA *et al*., 2015). A maior resistência às sulfonamidas também pode estar relacionada com uma ampla distribuição dos genes de resistência para esta classe farmacológica (EFSA; ECDC, 2015).

Entre as cepas analisadas, 32,9% (80/243) foram resistentes à ciprofloxacina e 16,9% (41/243) à enrofloxacina. Foi observado que as cepas que apresentaram resistência à enrofloxacina também foram resistentes à ciprofloxacina, com exceção de uma única cepa. A enrofloxacina e a ciprofloxacina pertencem à classe das fluorquinolonas e são amplamente utilizadas em veterinária e em medicina humana, respectivamente (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005). A WHO classifica estes antimicrobianos como extremamente importantes para medicina humana e recomenda atenção especial quanto à vigilância da resistência antimicrobiana nos animais, pois a resistência pode ser o resultado da transferência de cepas a partir de fontes não humanas (WHO 2011b). Além disto, as fluorquinolonas são consideradas os antimicrobianos de eleição para o tratamento da salmonelose em humanos (WHO, 2011a; EFSA; ECDC, 2015). Apesar de a enrofloxacina ser utilizada apenas em animais, já foi demonstrado que bactérias resistentes a este fármaco podem se tornar resistentes a outras substâncias relacionadas estruturalmente, como a ciprofloxacina (GONCAGÜL; GÜNAYDIN; ÇARLI, 2005; MARSHALL; LEVY, 2011; WHO, 2011a; WHO, 2011b). A WHO prioriza a redução do uso de quinolonas e fluorquinolonas em animais de produção (WHO, 2011a). A utilização de enrofloxacina em aves está proibida desde 2005 nos Estados Unidos (CLSI, 2008). Na Austrália e na Finlândia, onde o seu uso nunca foi permitido em animais de produção, a taxa de bactérias resistentes à ciprofloxacina em humanos é muito baixa,

especialmente quando comparada às taxas dos países onde o seu uso é permitido ou foi permitido durante vários anos (COLLIGNON, 2005; CHENG *et al.*, 2012).

No trabalho, apenas 4,1% (10/243) das cepas foram resistentes ao ceftiofur. Uma vez que o uso das fluorquinolonas não é recomendado para crianças devido aos potenciais efeitos adversos (EFSA; ECDC, 2015), as cefalosporinas de terceira geração são a primeira opção para o tratamento de salmonelose nestes pacientes (WHO, 2011a; EFSA; ECDC, 2015). Por esta razão, esta classe de antimicrobianos também é considerada como extremamente importante para a medicina humana (WHO, 2011b). Como cepas resistentes ao ceftiofur podem apresentar resistência cruzada à ceftriaxona, cefalosporina de terceira geração amplamente empregada para o tratamento de crianças, é importante o monitoramento da suscetibilidade das cepas também frente a este antimicrobiano (FOLEY; LYNN, 2008; NARMS, 2015). O monitoramento da resistência a este antimicrobiano também é importante para a detecção de cepas produtoras de β-lactamases de espectro estendido (*Extended Spectrum β-Lactamases* – ESBL). Estas cepas possuem enzimas modificadas que aumentam a resistência bacteriana frente às cefalosporinas de amplo espectro, como a cefotaxima e ceftazidima, e os monobactâmicos, como o aztreonam (SILVA; LINCOPAN, 2012; BRASIL, 2015b; EFSA; ECDC, 2015; KOBAYASHI, 2015). Apesar de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* serem as espécies produtoras de ESBL mais comuns, a detecção destas enzimas já foi observada em outras enterobactérias, incluindo *Salmonella* spp. (EFSA; ECDC, 2015).

Observou-se que 12,3% (30/243) das cepas foram resistentes à tetraciclina. Dados disponíveis na literatura também indicam este antimicrobiano como um dos fármacos que apresenta maior taxa de cepas resistentes (EFSA; ECDC, 2015; MATTIELO *et al.*, 2015; NARMS, 2015; PROROGA *et al.*, 2015; ZIECH *et al.*, 2016). Uma possível razão para esta alta resistência é a sua ampla utilização, inclusive na avicultura (MACHINSKI JUNIOR *et al*., 2005; WHO, 2011a). No Brasil não existe controle do uso terapêutico em veterinária, mas é proibida a sua utilização como aditivo zootécnico (BRASIL, 2009).

Apesar de 94,2% (229/243) das cepas serem suscetíveis à gentamicina e 91,4% à espectinomicina, a sua utilização destes antimicrobianos para fins terapêuticos requer cautela, pois é possível que os aminoglicosídeos não sejam clinicamente efetivos para *Salmonella* spp., mesmo quando apresentam resultados satisfatórios em testes *in vitro* (CLSI, 2013). Isto provavelmente se deve ao fato de que os aminoglicosídeos foram amplamente empregados, especialmente em medicina veterinária, o que pode ter

resultado na seleção de cepas clinicamente resistentes (SCHWARZ; KEHRENBERG; WALSH, 2001; MATTIELO *et al.*, 2015).

Apesar de o uso de cloranfenicol em animais de produção estar proibido no Brasil desde 2003 (BRASIL, 2003), dez cepas apresentaram resistência a este antimicrobiano, sendo que sete foram isoladas em 2012, ou seja, nove anos após a proibição. Dados da Fiocruz também demonstram que as cepas de *Salmonella* spp. continuam apresentando resistência a este fármaco mesmo após a sua proibição (RODRIGUES, 2008). Por muito tempo o uso do cloranfenicol foi permitido, o que pode ter causado uma pressão seletiva, favorecendo a seleção de cepas resistentes (KEMPF *et al.*, 2013). A reversão desta resistência pode não ter sido superada, e é possível que muitas cepas circulantes possuam os genes de resistência ao cloranfenicol (MATTIELO *et al.*, 2015). Outra possibilidade é que o emprego do florfenicol, de uso exclusivo em veterinária, estaria exercendo uma pressão seletiva nas cepas e favorecendo a transmissão de genes de resistência comuns a estes dois antimicrobianos (NOGRADY *et al.*, 2005). Mattielo *et al*. (2015) também destacam a possibilidade de a resistência ao cloranfenicol ter sido co-selecionada com outros antimicrobianos cujos determinantes de resistência estejam localizados nos mesmos elementos genéticos móveis.

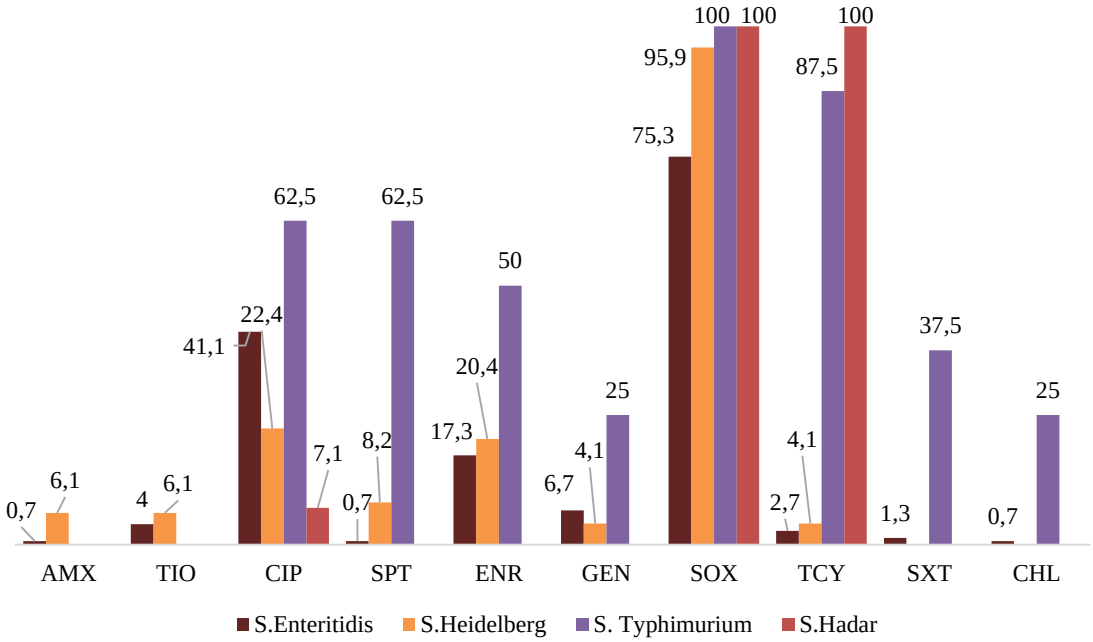
Sugere-se em estudos futuros a realização do teste de suscetibilidade para outros antimicrobianos de interesse. Com estes dados será possível determinar perfis de suscetibilidade abrangendo os antimicrobianos de interesse internacional. Além disto, também é interessante determinar a CIM das cepas classificadas como parcialmente suscetíveis ou intermediárias. A determinação da CIM permite que estes antimicrobianos sejam utilizados para o tratamento clínico, especialmente na avicultura, onde existe uma restrição do uso de algumas destas substâncias.

Dados oficiais do CDC, do EFSA/ECDC e do Programa Integrado Canadense para Vigilância da Resistência Antimicrobiana (*Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance* – CIPARS) demonstram que o potencial para aquisição de resistência antimicrobiana pode variar entre os sorovares (CIPARS, 2013; CDC, 2015; EFSA; ECDC, 2015). Desta forma, a contribuição relativa de cada sorovar também pode influenciar no nível geral de resistência para o gênero *Salmonella* (EFSA; ECDC, 2015).

A comparação da resistência antimicrobiana entre os sorovares também foi feita neste trabalho. A frequência relativa das cepas resistentes a cada antimicrobiano para os

sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Heidelberg, *S.* Typhimurium e *S.* Hadar está descrita no Gráfico 5.

Gráfico 5 – Frequência relativa (%) de cepas resistentes aos antimicrobianos testados conforme o sorovar: *S.* Enteritidis (n=150), *S.* Heidelberg (n=49), *S.* Typhimurium (n=8) e *S.* Hadar (n=14).



Legenda: amoxicilina (AMX), ceftiofur (TIO), ciprofloxacina (CIP), espectinomicina (SPT), enrofloxacina (ENR), gentamicina (GEN), sulfafurazol (SOX), tetraciclina (TCY), sulfa + trimetoprim (SXT), cloranfenicol (CHL).

Devido ao menor tamanho amostral de alguns sorovares, apenas as cepas destes quatro sorovares foram selecionadas para a análise estatística. Observou-se associação entre a resistência antimicrobiana e o sorovar em dez situações, conforme demonstrado na Tabela 9.

Tabela 9 – Associação entre a resistência a um determinado antimicrobiano e os sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Hadar, *S.* Heidelberg e *S.* Typhimurium.

Antimicrobiano	Sorovar			
	S. Enteritidis	*S.* Hadar	*S.* Heidelberg	*S.* Typhimurium
Amoxicilina			X	
Ciprofloxacina	X			X
Espectinomicina			X	X
Sulfafurazol	X			
Tetraciclina		X	X	
Sulfa + trimetoprim				X
Cloranfenicol				X

Legenda: "X" indica associação entre o sorovar e o antimicrobiano ($p<0,05$).

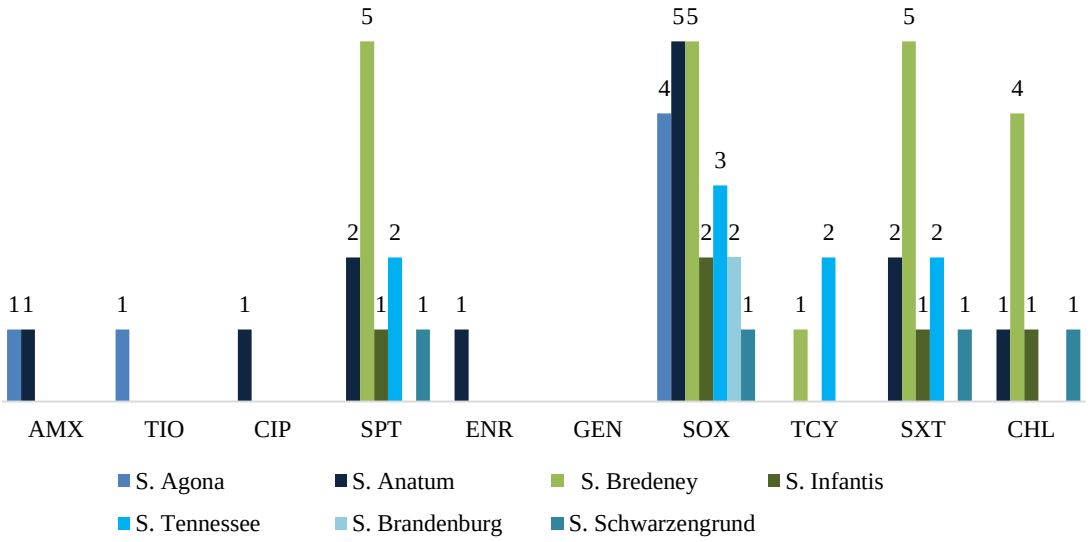
As maiores taxas de resistência observadas para as cepas do sorovar *S.* Enteritidis foram frente ao sulfafurazol (75,3%), ciprofloxacina (41,3%) e enrofloxacina (17,3%), resultados similares aos índices nacionais apresentados pela Fiocruz (RODRIGUES, 2008). Conforme o CDC (2015), este sorovar tem apresentado altas taxas de resistência a diversos antimicrobianos avaliados nos Estados Unidos nos últimos anos.

As cepas de *S.* Typhimurium analisadas apresentaram alta resistência frente a sulfafurazol (100%), tetraciclina (87,5%), ciprofloxacina (62,5%), espectinomicina (62,5%), enrofloxacina (50%), sulfa associada ao trimetoprim (37,5%), cloranfenicol (25%) e gentamicina (25%). *S.* Typhimurium é considerado um sorovar com alta taxa de resistência aos fármacos mais comumente utilizados (WHO, 2011a, WHO, 2011b). No Brasil, dados da Fiocruz (RODRIGUES, 2008) indicam que as cepas de *S.* Typhimurium são altamente resistentes a diversos antimicrobianos, tais como estreptomicina, ampicilina, florfenicol, sulfonamidas, tetraciclina e sulfas combinadas com trimetoprim. Entretanto, Rodrigues (2008) relata uma baixa resistência das cepas deste sorovar à enrofloxacina, diferentemente do que foi observado neste estudo. É importante salientar que estes dados se referem a cepas isoladas até o ano de 2008 e neste intervalo de tempo pode ter ocorrido uma mudança no perfil de suscetibilidade antimicrobiana do sorovar. Órgãos oficiais internacionais também relataram altas taxas de cepas de *S.* Typhimurium resistentes a vários antimicrobianos nos últimos anos (CIPARS, 2013; CDC, 2015; EFSA; ECDC, 2015).

As cepas de *S.* Hadar avaliadas foram 100% resistentes à tetraciclina e ao sulfafurazol e 7,1% foram resistentes à ciprofloxacina. Todas as cepas foram suscetíveis aos demais antimicrobianos. As cepas de *S.* Heidelberg foram altamente resistentes ao sulfafurazol (95,9%), à ciprofloxacina (22,4%) e à enrofloxacina (20,4%). O aumento do número de cepas de *S.* Heidelberg apresentando resistência a um grande número de antimicrobianos já foi descrito nos Estados Unidos (CDC, 2013; CDC, 2015) e também foi observado entre as cepas analisadas neste estudo.

A frequência absoluta das cepas resistentes a cada antimicrobiano para os sorovares *S.* Agona, *S.* Anatum, *S.* Bredeney, *S.* Infantis, *S.* Tennessee, *S.* Brandenburg e *S.* Schwarzengrund estão descritas no Gráfico 6.

Gráfico 6 – Frequência absoluta de cepas resistentes aos antimicrobianos testados conforme o sorovar: *S.* Agona (n=4), *S.* Anatum (n=5), *S.* Bredeney (n=5), *S.* Infantis (n=2), *S.* Tennessee (n=3), *S.* Brandenburg (n=2) e *S.* Schwarzengrund (n=1).



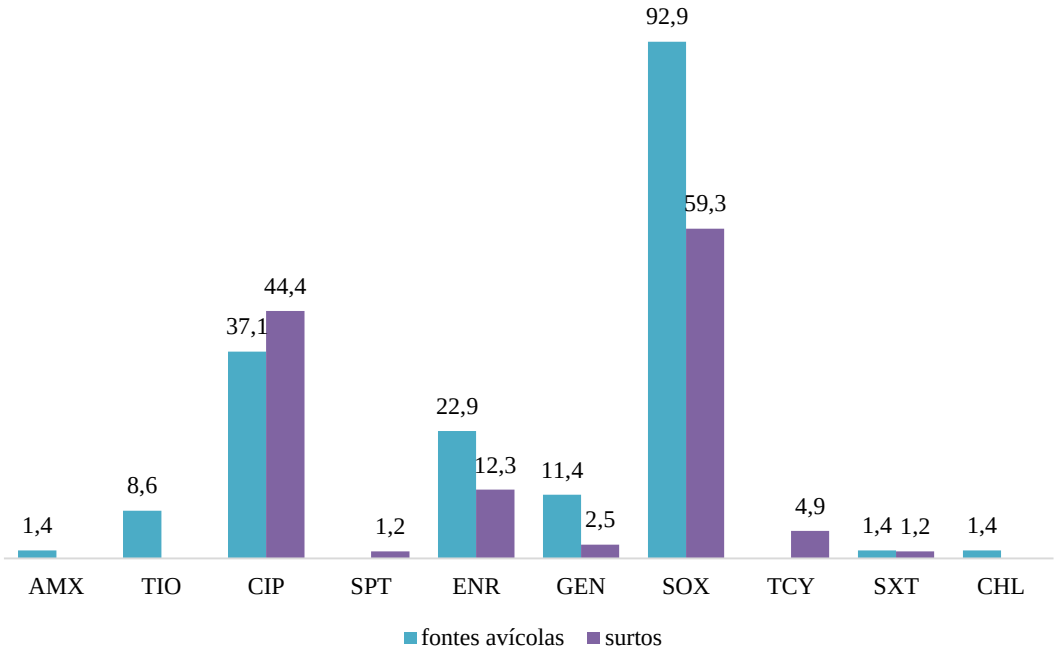
Legenda: amoxicilina (AMX), ceftiofur (TIO), ciprofloxacina (CIP), espectinomicina (SPT), enrofloxacina (ENR), gentamicina (GEN), sulfafurazol (SOX), tetraciclina (TCY), sulfa + trimetoprim (SXT), cloranfenicol (CHL).

Observa-se uma tendência geral das cepas deste sorovares a uma maior resistência ao sulfafurazol, à espectinomicina e à sulfa associada ao trimetoprim. Destaca-se que todas as cepas de *S.* Bredeney foram resistentes ao sulfafurazol, à espectinomicina, à sulfa associada ao trimetoprim e ao cloranfenicol, com exceção de uma cepa.

As variações nos níveis de resistência antimicrobiana observados entre os diferentes sorovares no estudo podem ser resultantes da transferência seletiva de elementos genéticos móveis ou da presença de determinantes genéticos de resistência antimicrobiana em sorovares específicos (PANDE *et al.*, 2015).

A relação entre a presença de bactérias resistentes em humanos e o uso dos antimicrobianos em animais de produção é continuamente estudada, especialmente nos Estados Unidos (MARSHALL; LEVY, 2011). A WHO considera a resistência antimicrobiana em humanos e animais como o principal desafio em saúde pública no século XXI. No Gráfico 7 é realizada a comparação da frequência relativa de cepas resistentes de *S.* Enteritidis isoladas de fontes avícolas, incluindo as cepas isoladas do campo e de produtos, e aquelas isoladas de surtos frente aos dez antimicrobianos selecionados.

Gráfico 7 – Frequência relativa (%) de cepas de *Salmonella* Enteritidis resistentes aos antimicrobianos testados isoladas de fontes avícolas e de surtos.



Legenda: amoxicilina (AMX), ceftiofur (TIO), ciprofloxacina (CIP), espectinomicina (SPT), enrofloxacina (ENR), gentamicina (GEN), sulfafurazol (SOX), tetraciclina (TCY), sulfa + trimetoprim (SXT), cloranfenicol (CHL).

Analisando-se a resistência global das cepas de ambas as origens, observa-se uma maior resistência entre as cepas isoladas de fontes avícolas, uma vez que 94,3% das cepas foram resistentes a um antimicrobiano ou mais. Entre as cepas isoladas de surtos, este índice foi inferior a 75%. Outros autores já constataram esta maior resistência em cepas de origem aviária em relação àquelas isoladas de surtos (OLIVEIRA *et al.*, 2005; CAILHOL *et al.*, 2006; VAZ *et al.*, 2010). A partir dos dados oficiais dos Estados Unidos, Foley e Lynne (2008) compararam o perfil de suscetibilidade antimicrobiana de cepas isoladas de diversas espécies de animais de produção com cepas isoladas de humanos e descreveram que, independentemente da espécie, a resistência é maior nos animais.

Observou-se associação significativa ($p<0,05$) da resistência antimicrobiana com a origem das cepas em três situações. A resistência ao ceftiofur, à gentamicina e ao sulfafurazol está associada às cepas de origem avícola. O uso exclusivo do ceftiofur em medicina veterinária e o amplo emprego das sulfas na avicultura podem justificar esta associação com as cepas aviárias. A gentamicina é especialmente utilizada em incubatórios e para o tratamento de enterobactérias, o que poderia ocasionar a propagação de cepas resistentes a este antimicrobiano no campo (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005).

É interessante observar que cepas isoladas de humanos foram resistentes à enrofloxacina, usada exclusivamente em animais. Da mesma forma, cepas isoladas de fontes avícolas foram resistentes à ciprofloxacina, antimicrobiano empregado em medicina humana. Esta situação pode ser explicada pela relação estrutural similar dos antimicrobianos (MARSHALL; LEVY, 2011) e pela transmissão de clones de origem animal aos humanos (GONCAGÜL; GÜNAYDIN; ÇARLI, 2005; MARSHALL; LEVY, 2011).

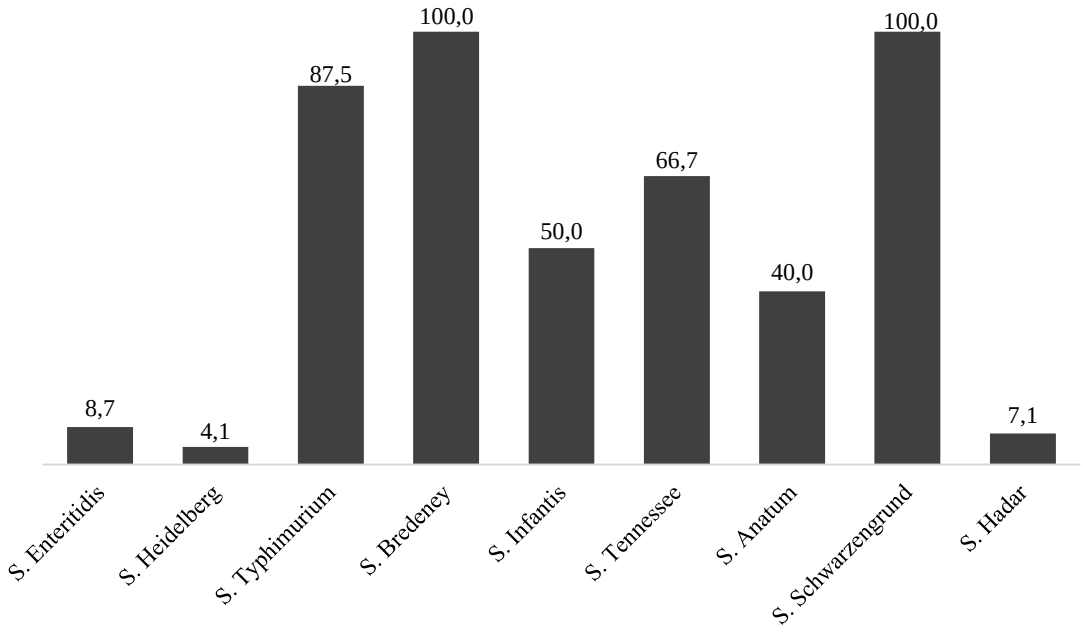
O Brasil ainda não possui programas integrados para o monitoramento da resistência antimicrobiana dos principais patógenos de humanos e de animais de produção, como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp., por exemplo. A análise do comportamento destes patógenos nas duas populações permitiria que novas medidas de controle e de restrição no uso dos antimicrobianos fossem adotadas. Entretanto, é necessário que este sistema seja de fácil acesso tanto aos laboratórios da rede oficial, quanto para aqueles das redes pública e privada de diagnóstico.

Cepas multirresistentes de *Salmonella* spp. estão associadas com o aumento de hospitalizações, assim como de mortes e do custo necessário para o tratamento (WHO, 2011b). No estudo, as cepas que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos foram consideradas multirresistentes e corresponderam a 13,9% (34/243) do total analisado. A frequência de cepas multirresistentes encontrada neste estudo foi mais baixa do que a relatada em trabalhos anteriores. Nos Estados Unidos, 80% das cepas de *Salmonella* spp. foram classificadas como multirresistentes no recente trabalho de Pulido-Landinez *et al.* (2014). Na Itália, detectou-se 54,3% de cepas resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (PROROGA *et al*., 2015). No Brasil, a Fiocruz identificou, em 2001, 7,1% de cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes. Em 2007 esta taxa praticamente triplicou, sendo que cerca de 20% das cepas foram consideradas multirresistentes (BRASIL, 2015a). Estudo recente analisando cepas de *Salmonella* spp. isoladas na região sul do Brasil detectou 86% de cepas multirresistentes (ZIECH *et al.*, 2016). No RS, estudos realizados nos últimos anos indicam uma frequência de cepas multirresistentes de aproximadamente 23% (TONDO; RITTER, 2012). Algumas cepas avaliadas no presente estudo foram isoladas há mais de dez anos, o que pode explicar a menor frequência de cepas multirresistentes encontradas. Os resultados obtidos indicam que o aumento da resistência antimicrobiana é uma questão preocupante em todo mundo, mesmo existindo diferenças entre as metodologias e os antimicrobianos avaliados nos estudos (LERTWORAPREECHA; SUTTHIMUSIK; TONTIKAPONG,

2013). Um dado bastante preocupante é que praticamente todas as cepas pertencentes ao sorovar *S.* Typhimurium, frequentemente isolado de casos de salmonelose em humanos, foram multirresistentes no presente estudo. Dados dos Estados Unidos indicam *S.* Typhimurium e *S.* Heidelberg são os sorovares que apresentam cepas multirresistentes com maior frequência (NARMS, 2011).

Entre os onze sorovares analisados, nove apresentaram cepas classificadas como multirresistentes, conforme demonstrado no Gráfico 8.

Gráfico 8 – Frequência relativa (%) de cepas classificadas como multirresistentes (resistência a três ou mais classes de antimicrobianos) conforme o sorovar.



Quanto à origem das cepas multirresistentes do estudo, 88,2% (30/34) são provenientes de produtos avícolas e 11,8% (4/34) de surtos de salmonelose em humanos. Apesar de existirem evidências de que a resistência em humanos para patógenos como *Salmonella* spp. é possivelmente oriunda do emprego de antimicrobianos em animais de produção (WHO, 2011a; WHO, 2011b; COLLINGSON, 2012), o controle ainda não é adotado de forma eficaz em todos os setores da cadeia avícola. Além disto, a globalização e o consequente comércio de produtos de origem animal entre os países permitem que cepas multirresistentes sejam disseminadas para diferentes regiões (WHO, 2011b, EFSA; ECDC, 2015). Alguns fatores como viagens ao exterior, comércio internacional de alimentos, criação de animais de diferentes espécies no mesmo ambiente e a estrutura

vertical de alguns sistemas de produção animal também podem influenciar na propagação de cepas resistentes (EFSA; ECDC, 2015).

5.2.2.2 Determinação do perfil genotípico de resistência antimicrobiana

Para determinar o perfil genotípico de resistência antimicrobiana foi realizada a pesquisa de 12 genes envolvidos nos mecanismos de resistência entre as 34 cepas classificadas como multirresistentes no teste fenotípico. Apenas os genes *bla*$_{PSE}$ e *floR* não foram detectados em nenhuma cepa. Entre as cepas analisadas, 79,4% (27/34) apresentaram pelo menos um gene e 35,3% (12/34) apresentaram três ou mais, sendo que duas cepas de *S.* Typhimurium apresentaram seis genes e uma de *S.* Anatum apresentou sete genes.

A resistência aos β-lactâmicos está relacionada com a habilidade das cepas em produzir β-lactamases, um grupo diverso de enzimas que se ligam à estrutura do antimicrobiano, rompendo o anel β-lactâmico (FOLEY; LYNNE, 2008; FRYE; JACKSON, 2013). Apesar de *bla*$_{TEM}$ ser considerado um dos genes mais frequentemente relacionados à resistência a estes antimicrobianos (ABRAHAM *et al.*, 2014; MATTIELO *et al.*, 2015; PANDE *et al.*, 2015), o gene não foi detectado em nenhuma cepa do estudo. O gene *bla*$_{PSE-1}$, também considerado frequente por outros autores (MIKO *et al.*, 2005), foi detectado em apenas uma cepa de *S.* Anatum que apresentou resistência fenotípica à amoxicilina. É possível que as demais cepas fenotipicamente resistentes aos antimicrobianos β-lactâmicos apresentem enzimas β-Lactamases distintas, codificadas por outros genes (MATTIELO *et al.*, 2015).

A resistência às sulfonamidas é frequentemente associada com a presença de enzimas diidropteroato sintetase modificadas que diminuem a afinidade ao antimicrobiano (FOLEY; LYNNE, 2008; FRYE; JACKSON, 2013). Estas enzimas são codificadas pelos genes *sulI* e *sulII*, detectados, respectivamente, em 29,7% (11/34) e 16,2% (6/34) das cepas. As frequências encontradas foram inferiores àquelas citadas em trabalhos anteriores (ANTUNES *et al.*, 2005; KOZAK *et al.*, 2009; MAKA *et al.*, 2015). Apesar de as 34 cepas apresentarem resistência à sulfa no teste fenotípico, apenas 38,2% (13/34) delas apresentaram pelo menos um dos genes. Este resultado indica que possivelmente a resistência à sulfa está associada a mecanismos não codificados pelos genes *sulI* e *sulII* (MAKA *et al*, 2015).

A resistência de *Salmonella* spp. aos aminoglicosídeos está relacionada às enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, que incluem as fosfotransferases, as adeniltransferases e as acetiltransferases (FOLEY; LYNNE, 2008; FRYE; JACKSON, 2013). O gene *aadA* codifica uma adeniltransferase responsável pela resistência à estreptomicina e foi detectado em 45,9% (17/34) das cepas. Os genes *strA* e *strB* codificam fosfotransferases também associadas com a resistência à estreptomicina e ambos foram encontrados em 16,2% (6/34) das cepas. Apenas três cepas apresentaram os três genes, e cinco foram positivas para *strA* e *strB* simultaneamente. Os genes *strA* e *strB* em geral fazem parte de plasmídeos (YAU *et al.*, 2010). Embora neste caso não seja possível estabelecer uma relação entre os testes fenotípico e genotípico, os dados encontrados se complementam para a avaliação do genótipo de resistência de *Salmonella* spp. aos aminoglicosídeos.

Um dos principais mecanismos de resistência às tetraciclinas é a presença das bombas de efluxo codificadas pelos genes *tet* (FOLEY; LYNNE, 2008). Na literatura, diversas classes de *tet* são descritas, sendo A, B, G e R as mais comuns (PEZELLA *et al.*, 2004; FRYE; JACKSON, 2013). No trabalho foram pesquisadas as classes A, B e G. Entre as cepas multirresistentes que foram resistentes à tetracilcina no teste fenotípico, 47% (16/34) apresentaram pelo menos um dos três genes pesquisados e 35,1% (13/34) apresentaram *tet*(A), gene que apresentou a maior frequência. O gene *tet*(A) pode estar localizado em transposons e é detectado tanto em plasmídeos quanto integrado ao cromossomo bacteriano, o que pode contribuir para sua disseminação na população de *Salmonella* spp. (PEZELLA *et al.*, 2004). De acordo com Pezella *et al.* (2004), o gene *tet*(B) pode ser detectado no cromossomo de diversos sorovares de *Salmonella*, incluindo *S.* Enteritidis, *S.* Hadar e *S.* Typhimurium. Entretanto, *tet*(B) foi detectado em apenas 5,4% (2/34) das cepas avaliadas no estudo. O gene *tet*(G) só foi detectado em uma cepa. Entre as 14 cepas multirresistentes que apresentaram resistência à tetraciclina no teste fenotípico, onze apresentaram o gene *tet*(A), duas o gene *tet*(G) e em uma não foi detectado nenhum dos três genes pesquisados.

A resistência de *Salmonella* spp. ao cloranfenicol também está associada com as bombas de efluxo, que em geral são codificadas pelos genes *floR* e *cmlA* (NOGRADY *et al.*, 2005; FOLEY; LYNNE, 2008; FRYE; JACKSON, 2013). Em algumas cepas a resistência é relacionada com a ação de acetiltransferases, codificadas pelos genes *cat*. No estudo, nenhuma cepa apresentou o gene *floR*, associado tanto à resistência ao florfenicol quanto ao cloranfenicol (DOUBLET *et al.*, 2005; NOGRADY *et al.*, 2005). O

gene *cmlA* foi detectado em 29,7% (11/34) das cepas. Nove cepas que apresentaram este gene também foram classificadas como resistentes ao cloranfenicol no teste fenotípico. Entretanto, duas cepas que apresentaram o *cmlA* foram classificadas como suscetíveis, indicando que, apesar da presença do gene, nem sempre este é expresso. Uma vez que o *cmlA* não confere resistência ao florfenicol, a disseminação do gene entre as cepas de *Salmonella* spp., especialmente naquelas de origem avícola, mesmo muitos anos após a proibição do uso do cloranfenicol em animais de produção, é provavelmente justificada pela sua localização em elementos genéticos móveis, que permitem que este gene seja disseminado horizontalmente em conjunto com outros cassetes gênicos de resistência (NOGRADY *et al.*, 2005).

Observou-se uma grande variedade de genes de resistência entre as 34 cepas multirresistentes analisadas, o que representa um grande problema em saúde pública devido à manutenção e ao risco de disseminação destes genes na população de *Salmonella*. É possível que a manutenção dos genes de resistência seja devida ao uso contínuo e indiscriminado de antimicrobianos (ÁLVAREZ, 2007; MADIGAN *et al.*, 2010).

A investigação genética dos mecanismos e dos genes associados à resistência às quinolonas e fluorquinolonas constitui-se em uma etapa muito importante a ser realizada no futuro. Também se sugere futuramente a pesquisa de genes de resistência que não foram contemplados no estudo, tais como aqueles envolvidos na resistência aos demais aminoglicosídeos, além de outros genes de resistência às tetraciclinas, aos β-lactâmicos e anfenicois. Também é fundamental a pesquisa destes genes em todas as cepas, incluindo-se aquelas não classificadas como multirresistentes no perfil fenotípico. Segundo Schwarz *et al.* (2010), o teste genotípico é preferível ao teste fenotípico para determinação das cepas multirresistentes. Logo, é possível que outras cepas sejam classificadas como multirresistentes após a pesquisa molecular.

5.3 Experimento III – Pesquisa de genes associados à virulência

5.3.1 Materiais e métodos

A caracterização molecular das cepas foi feita através da pesquisa de 27 genes associados à virulência (*invA, hilA, lpfA, lpfC, sefA, agfA, spvC, spvB, pefA, sopE, avrA, sivH, orgA, prgH, spaN, tolC, sipB, sitC, pagC, msgA, spiA, iroN, sopB, cdtB, sifA, sseL, stn*) utilizando-se a técnica de PCR. A função de cada um dos genes associados à virulência está descrita no APÊNDICE B.

A extração do DNA foi realizada através de tratamento térmico, adaptado a partir da técnica de Borsoi *et al.* (2009), conforme descrita anteriormente. As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Swift MaxPro (Esco; Singapura), onde as amostras foram submetidas a ciclos de desnaturação, anelamento e extensão. Após a amplificação, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. A análise dos produtos amplificados foi feita através da visualização das bandas correspondentes em transluminador de luz ultravioleta MacroVue (Pharmacia LKB Biotechnologies; Uppsala, Suécia) e da fotodocumentação digital (Alpha Innotech; San Leandro, EUA). A sequência dos *primers* utilizados, a concentração dos reagentes do *mix* e as condições de amplificação no termociclador foram adaptados a partir de trabalhos anteriores (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006; PETERSON *et al*., 2010; BARMAN *et al.*, 2013 BORGES *et al.*, 2013) e estão descritos no APÊNDICE B. Os controles positivos selecionados para cada um dos genes também estão descritos no APÊNDICE B. O controle negativo para todos os protocolos foi uma cepa padrão de *Mannheimia haemolytica* (ATCC 29694) e o controle negativo da reação corresponde ao conteúdo do *mix* sem a adição de DNA. Protocolos que apresentaram amostras com resultados negativos foram repetidos para confirmação do resultado.

5.3.2 Resultados e discussão

Para muitos patógenos, a virulência é conferida através de uma única região do genoma. Uma vez que a *Salmonella* spp. é capaz de invadir as células do hospedeiro, ela depende de um grande número de genes que estão distribuídos ao longo do seu cromossomo e em elementos genéticos móveis (GROISMAN; OCHMAN, 1997; SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). Com o desenvolvimento da biologia molecular,

tornou-se possível a identificação de alguns destes fatores de virulência (WASSENAAR; GAASTRA, 2001).

Todos os protocolos de PCR desenvolvidos foram eficazes para a detecção dos genes associados à virulência. A maioria dos genes apresentou uma alta frequência e uma distribuição regular, independentemente da origem de isolamento e dos sorovares das cepas. As frequências dos genes pesquisados são semelhantes àquelas descritas em outros estudos (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006; PETERSON *et al*., 2010; AKIYAMA *et al.*, 2011; ZOU *et al.*, 2011; DERAKHSHANDEH; FIROUZI; KHOSHBAKHT, 2013; ELEMFAREJI; THONG, 2013; GALDINO *et al.*, 2013; MEZAL, STEFANOVA; KHAN, 2013; BEN-ABDALLAH *et al.*, 2014; MEZAL *et al.*, 2014; KRAWIEC *et al*., 2015). Trabalhos anteriores que analisaram os diferentes sorovares de *Salmonella* spp. isolados de várias fontes demonstram que os genes de virulência estão amplamente distribuídos nas cepas circulantes. As frequências absoluta e relativa dos 27 genes de virulência pesquisados e agrupados conforme a função estão descritas na Tabela 10.

Tabela 10 – Distribuição dos 27 genes de virulência detectados através de PCR nas 243 cepas de *Salmonella* spp. independentemente da origem e do sorovar.

Função do gene		Gene	Frequência absoluta (n=243)	Frequência relativa (%)
Fímbrias		*sefA*	150	61,7
		lpfA	230	94,7
		lpfC	224	92,2
		agfA	238	97,9
		pefA	141	58
TTSS	Estrutura	*sipB*	226	93
		invA	243	100
		orgA	240	98,8
		prgH	226	93
		spaN	220	90,5
	Proteínas efetoras	*avrA*	241	99,2
		sopE	207	85,2
		sopB	240	98,8
		sivH	240	98,8
		sifA	236	97,1
	Proteína reguladora	*hilA*	243	100
Reconhecimento e sobrevivência no interior das células	Macrófago	*pagC*	228	93,8
		spiA	228	93,8
		msgA	243	100
	Outras células	*sseL*	243	100
		tolC	243	100
Plasmídeo		*spvB*	143	58,8
		spvC	146	60,1
Metabolismo do ferro		*iroN*	191	78,6
		sitC	231	95,1
Toxinas		*cdtB*	10	4,1
		stn	226	93

Os genes *sefA*, *lpfA*, *lpfC* e *pefA* estão associados às fímbrias. Todas as cepas apresentaram pelo menos um dos genes e 54,3% (132/243) apresentaram os quatro genes pesquisados. Todas as cepas do sorovar *S.* Enteritidis apresentaram o gene *sefA*, que não foi detectado em nenhuma cepa pertencente aos demais sorovares. Estes resultados estão de acordo com a literatura, visto que *sefA* é considerado o gene-alvo para detecção do sorovar *S.* Enteritidis (AMINI *et al.*, 2010; BORGES *et al.*, 2013). O gene *pefA* apresentou frequência significativamente ($p<0,05$) menor que os demais. Este resultado

pode ser justificado pela localização do gene. O gene *pefA* é de origem plasmidial, e os plasmídeos estão presentes em apenas alguns sorovares de *Salmonella* spp. (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). O gene *agfA* apresentou frequência significativamente ($p<0,05$) maior que os demais. Resultados semelhantes já foram observados nos primeiros trabalhos que pesquisaram a frequência deste gene. Doran *et al.* (1993) analisaram 604 cepas de *Salmonella*, pertencentes a 95 sorovares e observaram que 603 apresentaram *agfA*, indicando que o gene é altamente conservado entre os sorovares. O gene *agfA* é codificador da fímbria agregativa e está associado à adesão bacteriana a diversas superfícies inertes, incluindo aquelas utilizadas na cadeia de produção de alimentos. Por esta razão, também é considerado um gene importante para a produção de biofilmes (AUSTIN et al., 1998). Os genes *lpfA* e *lpfC* são codificados pelo mesmo *operon lpfABCDE* (BÄUMLER; HEFFRON, 1995), o que explica a ausência de diferença significativa ($p>0,05$) entre as frequências destes genes. Acredita-se que a aquisição e a perda de *operons* fimbriais específicos deve ser um dos mecanismos pelos quais os diferentes sorovares de *Salmonella* conseguiram se adaptar a um número cada vez maior de hospedeiros (BÄUMLER *et al.*, 1997). Estudos demonstram que as fímbrias possuem tropismo por diferentes tipos celulares em hospedeiros distintos. Por esta razão, é possível que a ausência de determinadas fímbrias altere a virulência da cepa (DARWIN; MILLER, 1999).

Diversos genes estão relacionados com os processos de reconhecimento do hospedeiro e de invasão celular. Entre eles estão àqueles associados aos TTSS, sistemas de secreção codificados pela SPI-1. O gene *hilA* codifica a proteína HilA, a principal reguladora dos TTSS, e sua expressão é mediada por fatores ambientais (FOLEY; LYNNE, 2008). Este gene, assim como observado no estudo, é encontrado em todas as cepas de *Salmonella* spp., sendo considerado um gene-alvo para a detecção do gênero (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012; CRACIUNAS *et al.*, 2012). O gene *invA*, associado à estrutura dos TTSS, também está presente em todas as cepas de *Salmonella* spp. e é considerado o principal gene-alvo para a detecção de cepas deste gênero através da técnica de PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2003; CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012; CRACIUNAS *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2013).

Os genes *orgA, sipB, prgH* e *spaN* também estão relacionados com a estrutura destes sistemas (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). Entre as cepas analisadas, 89,7% (218/243) apresentaram os quatro genes simultaneamente. O gene *spaN* apresentou frequência significativamente ($p<0,05$) menor que os demais, enquanto que *orgA* foi

significativamente ($p<0,05$) o mais frequente dos quatro genes. Este resultado está de acordo com os estudos anteriores (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). Uma possível justificativa para estes resultados é que o gene *orgA* é essencial para a invasão celular por *Salmonella* spp. (KLEIN; FAHLEN; JONES, 2000), enquanto que o gene *spaN* é um dos 12 genes que formam um *cluster* (complexo *inv-spa*) associado às propriedades de invasão (EMBL-EBI, 2016).

Os genes *sifA, avrA, sopE, sopB* e *sivH* codificam proteínas efetoras secretadas pelos TTSS. 80,7% (196/243) das cepas apresentaram os cinco genes. Os genes *sifA, avrA, sivH* e *sopB* foram detectados em praticamente todas as cepas e não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre si. Por outro lado, a frequência de *sopE* foi significativamente ($p<0,05$) menor do que a dos demais genes. Apesar de ambos os genes *sopB* e *sopE* codificarem proteínas Sop, eles não estão relacionados, uma vez que possuem funções e localizações diferentes. Conforme Hopkins e Threlfall (2004), uma das razões para a variação na frequência deste gene é que o mesmo se encontra em uma região onde a recombinação genética é frequente. Segundo os mesmos autores, a identificação do gene *sopE* pode auxiliar a identificar as cepas de *Salmonella* spp. que possuem um alto potencial para causarem surtos, uma vez que a aquisição deste gene é importante na emergência de cepas epidêmicas. A pesquisa de genes codificadores de proteínas efetoras é importante para a detecção de possíveis alterações no repertório destas proteínas, uma vez que isto pode significar mudanças na capacidade dos sorovares de *Salmonella* em se adaptar a novos hospedeiros, permitindo que se tornem emergentes (PRAGER *et al.*, 2000).

O gene *tolC*, codificador de proteína de membrana externa e associado ao processo de reconhecimento celular, foi detectado em todas as cepas. A alta frequência deste gene provavelmente está relacionada com a grande importância destas proteínas no processo inicial de invasão das células do hospedeiro (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). Após a invasão, a sobrevivência de *Salmonella* no interior da célula eucariótica representa uma vantagem sobre as defesas do hospedeiro. Todas as cepas avaliadas apresentaram o gene *sseL*, associado com a capacidade de replicação no interior da célula infectada (PETERSON *et al.*, 2010). Quando a *Salmonella* spp. permanece viável dentro dos macrófagos, ela se multiplica e se dissemina por todo o organismo, ocorrendo, assim, a infecção sistêmica (BÄUMLER *et al.*, 1997). Entre os três genes (*msgA, spiA, pagC*) associados à sobrevivência no interior de macrófagos, apenas *msgA* esteve presente em 100% das cepas analisadas. *spiA* e *pagC* apresentaram a mesma frequência (93,8%). A

ausência de um dos três genes não deve acarretar em prejuízos para a bactéria durante o processo infeccioso, uma vez que existem outros genes que codificam proteínas com funções semelhantes.

Além do gene fimbrial *pefA*, outros dois genes de origem plasmidial (*spvB* e *spvC*) também foram pesquisados. Apesar de os plasmídeos não estarem diretamente associados à interação inicial da *Salmonella* spp. com a mucosa intestinal e à invasão de tecidos mais profundos, eles favorecem a manutenção da bactéria no interior das células, além de auxiliar no início do processo de infecção sistêmica (ROTGER; CASADESÚS, 1999; CASTILLA *et al.*, 2006). Entre as cepas analisadas, 49,4% (120/243) apresentaram os três genes e 31,3% (76/243) não apresentaram nenhum. Os genes *spvB* e *spvC* são codificados pelo mesmo *operon spvRABCD* (KRAUSE; FANG; GUINEY, 1992), o que pode explicar a ausência de diferença significativa ($p>0,05$) entre as frequências destes genes. Assim como para o gene *pefA*, a baixa frequência de *spvB* e *spvC* também era esperada, uma vez que a presença de plasmídeos em cepas de *Salmonella* spp. está relacionada com o sorovar, sendo mais comum em *S.* Enteritidis (ROTGER; CASADESÚS, 1999; LING, 2009; CRACIUNAS *et al.*, 2010; JONG *et al.*, 2012).

Após a invasão celular, *Salmonella* spp. encontra um ambiente com quantidade restrita de ferro, elemento essencial para a sobrevivência e para o crescimento das cepas no interior da célula hospedeira (ZHOU; HARDT; GALÁN, 1999; ZARATÉ-BONILLA *et al.*, 2014). Consequentemente, as bactérias desenvolveram uma variedade de sistemas para aquisição de ferro, os quais geralmente são redundantes e não são expressos simultaneamente. Em geral, a expressão dos diferentes sistemas depende das condições em que a bactéria está inserida (ZHOU; HARDT; GALÁN, 1999). O gene *sitC* codifica uma permease, proteína de membrana associada com a captação de ferro (ZHOU; HARDT; GALÁN, 1999; SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006), enquanto o *iroN* codifica uma proteína que funciona como um receptor para sideróforos (BÄUMLER *et al.*, 1998; SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). A frequência de *iroN* foi significativamente ($p<0,05$) menor do que a do gene *sitC*. De acordo com Janakiraman e Slauch (2000), o gene *sitC* faz parte do *operon sitABCD* e é essencial para a virulência de *Salmonella* spp. É pouco provável que a ausência destes genes seja um problema para a sobrevivência e a multiplicação de *Salmonella* spp. no interior da célula hospedeira, uma vez que ela possui diversos mecanismos para captação de ferro.

O gene *cdtB* é um dos genes que codificam a toxina de distensão citoletal (CDT), associada à indução de apoptose das células infectadas e ao aumento da persistência de

bactérias patogênicas no hospedeiro (MEZAL; BAE; KHAN, 2014). Observou-se uma frequência muito baixa deste gene, sendo encontrado em apenas duas cepas de *S.* Brandenburg, duas de *S.* Tennessee, duas de *S.* Anatum, uma de *S.* Schwarzergrund e três de *S.* Bredeney. Estes resultados indicam que *cdtB* deve estar restrito a alguns sorovares de *Salmonella*, conforme anteriormente descrito na literatura (SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006). A função da enterotoxina codificada pelo gene *stn* como um fator de virulência ainda não está totalmente esclarecida (NAKANO *et al.*, 2012), mas é possível que esteja associada com a ocorrência de diarreia nos hospedeiros infectados (CHAUDHARY *et al*., 2015). O gene *stn* foi detectado em mais de 90% das cepas, demonstrando que está difundido na população de *Salmonella*, independentemente do sorovar.

Observou-se que a maioria dos genes está distribuída de forma uniforme entre as cepas. Entretanto, um estudo recente realizado demonstrou diferenças importantes na patogenicidade das cepas de *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium, quando avaliadas em modelos animais *in vivo*, o que poderia indicar diferenças nos seus pefis genéticos de virulência (LIMA, 2014). Para determinar a relação entre os genes de virulência e os sorovares, neste trabalho foi realizada a comparação das frequências absoluta e relativa dos genes analisados entre os sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Heidelberg, *S.* Hadar e *S.* Typhimurium conforme descrito na Tabela 11.

Tabela 11 – Frequências absoluta e relativa (%) da presença dos 27 genes de virulência pesquisados conforme os sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Heidelberg, *S.* Hadar e *S.* Typhimurium.

Genes	Sorovares de *Salmonella* – % (N)			
	S. Enteritidis (n=150)	*S.* Heidelberg (n=49)	*S.* Hadar (n=14)	*S.* Typhimurium (n=8)
invA	100 (150)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
hilA	100 (150)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
prgH	88,7 (133)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
tolC	100 (150)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
sefA	**100 (150)[a]**	**0 (0)[b]**	**0 (0)[b]**	**0 (0)[b]**
lpfA	**100 (150)[a]**	**100 (49)[a]**	**100 (14)[a]**	75 (6)
lpfC	**96 (144)[a]**	**100 (49)[a]**	**100 (14)[a]**	75 (6)
agfA	96,7 (145)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
pefA	**92,7 (139)[a]**	**2 (1)[b]**	**0 (0)[b]**	12,5 (1)
avrA	100 (150)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
sopB	98 (147)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
sopE	**99,3 (149)[a]**	**91,8 (45)[a]**	42,9 (6)	62,5 (5)
sivH	98 (147)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
orgA	99,3 (149)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
sipB	88,7 (133)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
spaN	86 (129)	98 (48)	100 (14)	100 (8)
sseL	100 (150)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
msgA	100 (150)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
spiA	90 (135)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
pagC	90 (135)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
iroN	**71,3 (107)[b]**	**91,8 (45)[a]**	**92,9 (13)[a]**	**100 (8)[a]**
sitC	92 (138)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
sifA	96,7 (145)	100 (49)	100 (14)	100 (8)
spvB	**81,3 (122)[a]**	**24,5 (12)[b]**	**0 (0)[b]**	12,5 (1)
spvC	**94, 7 (142)[a]**	**4,1 (2)[b]**	**0 (0)[b]**	12,5 (1)
cdtB	**0 (0)[b]**	**0 (0) [b]**	**0 (0) [b]**	**0 (0) [b]**
stn	91,3 (137)	93,9 (46)	100 (14)	100 (8)

Legenda:
Valores em negrito indicam associação significativa (p<0,05) entre o gene e o sorovar.
[a] Indica associação positiva.
[b] Indica associação negativa.

A presença de oito genes de virulência (*sefA, lpfA, lpfC, spvB, spvC, pefA, sopE* e *iroN*) está positivamente associada (p<0,05) com pelo menos um dos sorovares analisados. Por outro lado, observou-se associação negativa (p<0,05) entre a presença do gene *cdtB* e os sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Heidelberg, *S.* Hadar e *S.* Typhimurium. A associação negativa indica que este gene é restrito a alguns grupos, não sendo encontrado nos quatro sorovares analisados.

A presença do gene *sefA* está restrita ao sorovar *S.* Enteritidis, uma vez que o gene apresentou associação positiva (p<0,05) com este sorovar e negativa (p<0,05) com os demais. Também foi observada uma associação positiva (p<0,05) dos genes *lpfA* e *lpfC* com os sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Heidelberg e *S.* Hadar, demonstrando que, apesar de ser considerado conservado dentro do gênero *Salmonella* (BÄUMLER; HEFFRON, 1995; DORAN *et al.*, 1996), o *operon lpfABCDE* é mais frequente em alguns sorovares em relação a outros.

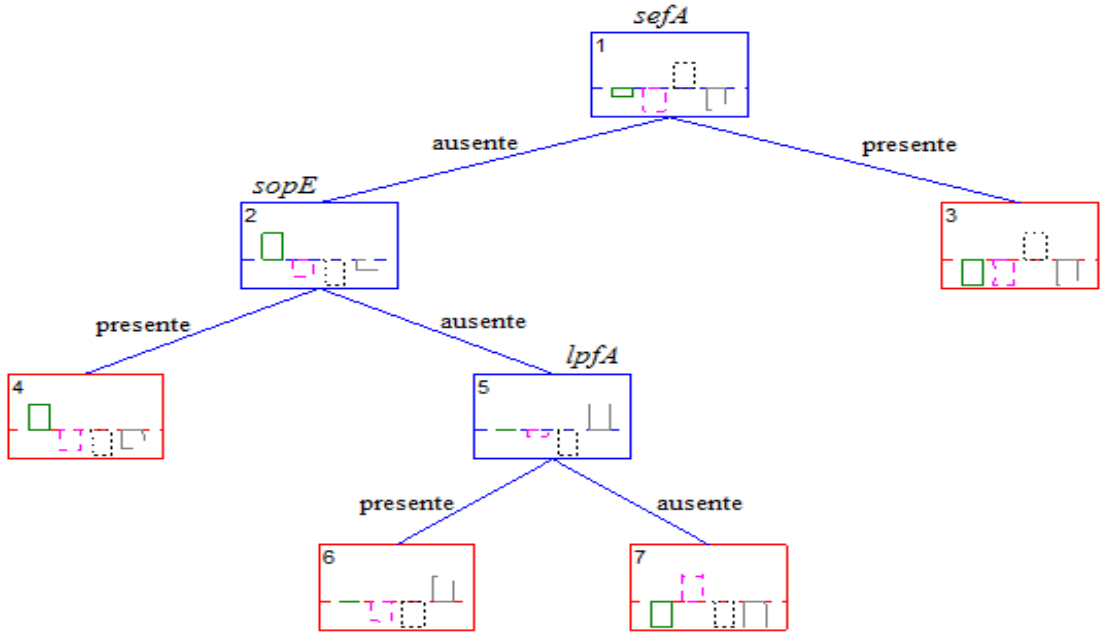
Os genes plasmidiais *spvB, spvC* e *pefA* estão positivamente associados (p<0,05) ao sorovar *S.* Enteritidis. Também foi encontrada uma associação negativa (p<0,05) entre estes genes e os sorovares *S.* Hadar e *S.* Heidelberg. Segundo Rychlik *et al.* (2006), os sorovares *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium tendem a apresentar plasmídeos, enquanto outros sorovares, como *S.* Typhi, *S.* Hadar e *S.* Infantis, geralmente não apresentam estes elementos móveis.

O gene *sopE* está positivamente associado (p<0,05) aos sorovares *S.* Enteritidis e *S.* Heidelberg. A variação de frequência do gene *sopE* entre os sorovares pode estar relacionada a sua localização, uma vez que se encontra em um bacteriófago. Além dos fagos terem predileção por determinados sorovares, eles também facilitam a transmissão horizontal de genes bacterianos (MIROLD *et al.*, 1999).

O gene *iroN* apresentou associação positiva (p<0,05) com os sorovares *S.* Typhimurium, *S.* Heidelberg e *S.* Hadar e negativa (p<0,05) com *S.* Enteritidis. Este resultado difere do trabalho publicado por Skyberg, Logue e Nolan (2006) que indica que o gene estaria distribuído igualmente entre os diferentes sorovares de *Salmonella*.

Posteriormente à análise descrita na Tabela 11, árvores de classificação foram construídas para determinar a existência de possíveis genes marcadores dos sorovares *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Heidelberg e *S.* Hadar. Os genes *sefA*, *sopE* e *lpfA* foram selecionados devido à associação significativa (p<0,05) com os sorovares, conforme demonstrado no Gráfico 9.

Gráfico 9 – Árvore de classificação das cepas de *S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Heidelberg e *S.* Hadar com base nos genes de virulência *sefA*, *sopE* e *lpfA*.



Legenda:

S. Heidelberg
S. Typhimurium
S. Enteritidis
S. Hadar

A presença do gene *sefA* indica o sorovar *S.* Enteritidis. A ausência do gene *sefA* em conjunto com a presença do gene *sopE* determina o sorovar *S.* Heidelberg. A ausência destes dois genes e a presença do gene *lpfA* indica cepas do sorovar *S.* Hadar, enquanto que a ausência dos três genes determina cepas do sorovar *S.* Typhimurium. A árvore de decisão constitui-se em uma ferramenta útil para determinar a classificação dos quatro sorovares através da pesquisa de genes de virulência. Entretanto, devido a uma possível variação dos genes *lpfA* e *sopE*, esta técnica deve ser utilizada em conjunto com outras ferramentas.

Neste trabalho foi realizada a comparação das frequências absoluta e relativa dos genes analisados entre as cepas de *S.* Enteritidis isoladas de fontes avícolas e de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose em humanos, a fim de se determinar se a origem de isolamento está relacionada com a presença dos genes de virulência. Observou-se associação significativa ($p<0,05$) entre a presença de nove genes de virulência (*spvB, spiA, pagC, sipB, prgH, spaN, sitC, lpfC* e *iroN*) e a fonte de isolamento da cepa, conforme descrito na Tabela 12.

Tabela 12 – Frequências absoluta e relativa (%) da presença dos 27 genes de virulência conforme a origem de isolamento das cepas de *S.* Enteritidis.

Gene	Origem de isolamento da cepa – % (N)	
	Fontes avícolas (n=70)	Alimentos envolvidos em surtos de salmonelose (n=80)
invA	100 (70)	100 (80)
hilA	100 (70)	100 (80)
prgH	**100 (70)[a]**	78,8 (63)
tolC	100 (70)	100 (80)
sefA	100 (70)	100 (80)
lpfA	100 (70)	100 (80)
lpfC	**100 (70)[a]**	92,5 (74)
agfA	100 (70)	93,8 (75)
pefA	90 (63)	95 (76)
avrA	100 (70)	100 (80)
sopB	100 (70)	96,3 (77)
sopE	98,6 (69)	100 (80)
sivH	100 (70)	96,3 (77)
orgA	100 (70)	98,8 (79)
sipB	**100 (70)[a]**	78,8 (63)
spaN	**100 (70)[a]**	78,8 (63)
sseL	100 (70)	80 (100)
msgA	100 (70)	80 (100)
spiA	**100 (70)[a]**	81,3 (65)
pagC	**100 (70)[a]**	81,3 (65)
iroN	55,7 (39)	**85 (68)[a]**
sitC	**100 (70)[a]**	85 (68)
sifA	98,6 (69)	95 (76)
spvB	**91,4 (64)[a]**	72,5 (58)
spvC	91,4 (64)	97,5 (78)
cdtB	0 (0)	0 (0)
stn	100 (70)	92,5 (74)

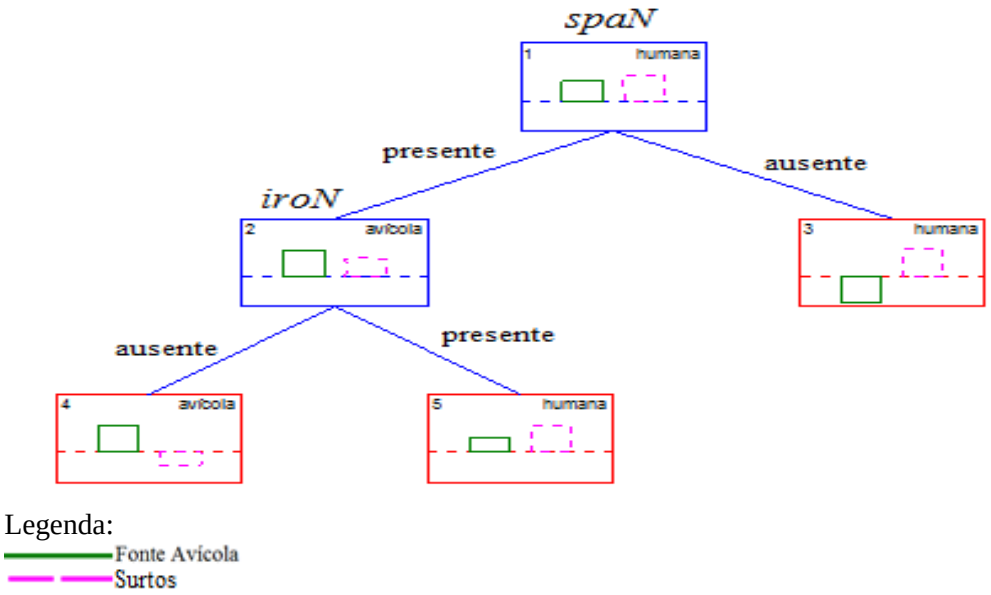
Legenda:
Valores em negrito indicam associação significativa (p<0,05) entre o gene e a origem de isolamento da cepa.
[a] Indica associação positiva.

Os genes *spvB, spiA, pagC, sipB, prgH, spaN, sitC* e *lpfC* estão positivamente associados (p<0,05) com as cepas isoladas de fontes avícolas, enquanto que o gene *iroN* apresentou associação positiva (p<0,05) com as cepas isoladas de surtos. Apesar destes resultados, dados da literatura indicam que não existe relação entre a fonte de isolamento

de uma cepa e o seu repertório de genes de virulência (OLIVEIRA *et al.*, 2003; SALISBURY; BRONOWKSI; WIGLEY, 2011; MEZAL; STEFANOVA; KHAN, 2013).

Posteriormente à análise descrita na Tabela 12, árvores de classificação foram construídas para determinar a existência de possíveis genes marcadores das origens de isolamento das cepas. Os genes *spaN* e *iroN* foram selecionados devido à associação significativa (p<0,05) com as fontes de isolamento, conforme demonstrado no Gráfico 10.

Gráfico 10 – Árvore de classificação das cepas de *S.* Enteritidis isoladas de fontes avícolas e de surtos com base nos genes de virulência *spaN* e *iroN*.



A ausência do gene *spaN* está relacionada com as cepas isoladas de surtos, enquanto que a presença deste gene não diferencia as duas origens. A presença de *spaN* e de *iroN* também identifica as cepas isoladas de surtos. A ausência de *iroN* e a presença de *spaN* estão associadas com as cepas de fontes avícolas.

Com os dados obtidos neste experimento, é possível observar que, apesar da ampla distribuição dos genes nos diferentes sorovares e independentemente da origem, a variação de alguns genes está associada a sorovares específicos ou a uma determinada origem. As exceções são os genes *lpfC* e *iroN*, que estão associados tanto com a origem, quanto com o sorovar da cepa.

É importante observar que a caracterização gênica das cepas de *Salmonella* spp., com base na presença ou ausência dos genes, realiza apenas uma análise qualitativa. Desta

forma, não é possível estabelecer uma relação linear entre a presença dos genes e a virulência da cepa. Skyberg, Logue e Nolan (2006) compararam cepas de *Salmonella* isoladas de aves saudáveis com aquelas isoladas de aves doentes e observaram uma forte similaridade nos genótipos de virulência de ambos os grupos. Este resultado demonstra que as cepas de aves saudáveis também são capazes de causar doença. Segundo estes autores, cepas de *E. coli* isoladas de aves saudáveis apresentam diferenças nos perfis genéticos quando comparados com aqueles de cepas isoladas de aves doentes. Desta forma, a genotipagem de virulência com os genes estudados não é suficiente para determinar virulência. Por esta razão, é sugerido o uso de ferramentas que levem em consideração a expressão dos genes e a interação entre eles em estudos posteriores. Futuramente, os dados obtidos pela biologia molecular devem ser relacionados com os índices de patogenicidade *in vivo* para *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium que foram gerados no CDPA em trabalho anterior realizado por Lima (2014).

5.4 Experimento IV - Determinação molecular do fagotipo PT4 de *Salmonella* Enteritidis

5.4.1 Materiais e Métodos

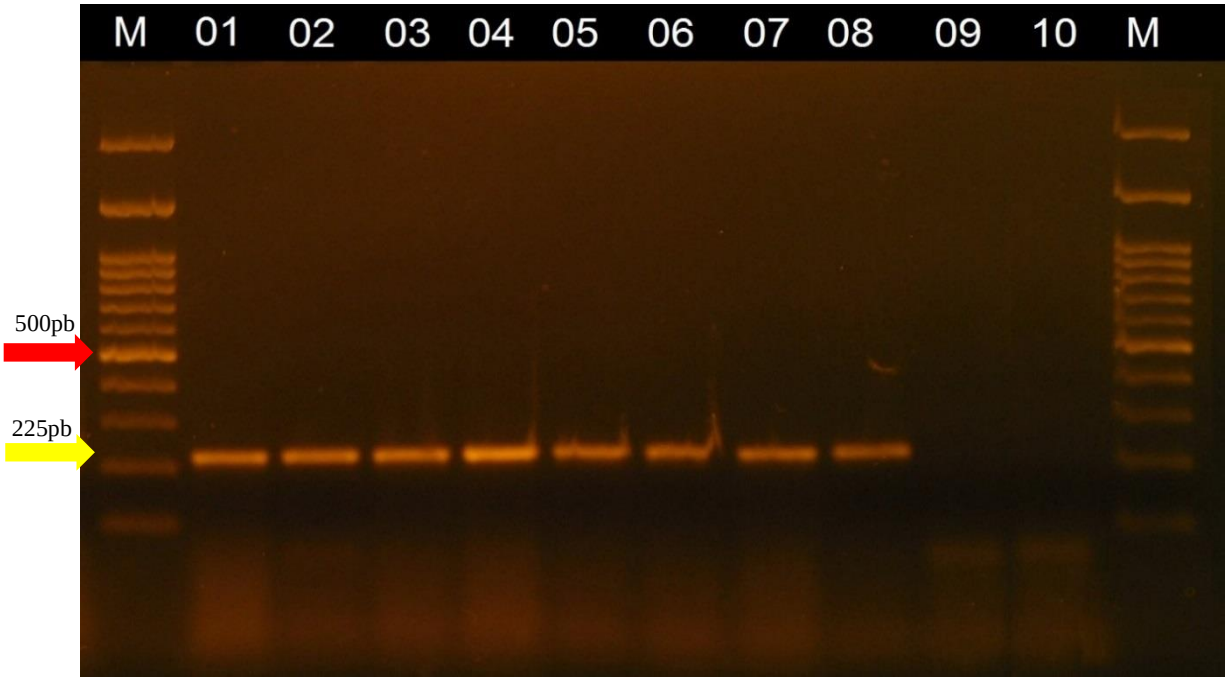
A identificação do fagotipo quatro (PT4) nas 150 cepas de *S.* Enteritidis foi realizada através da amplificação de uma sequência nucleotídica conservada específica deste fagotipo através da técnica de PCR. As sequências dos *primers* (F: GGCGATATAAGTACGACCATCATGG | R: GCACGCGGCACAGTTAAAA) foram obtidas a partir do trabalho de Peterson *et al.* (2010), assim como as concentrações dos reagentes do *mix* e as condições do termociclador. Para o preparo do *mix* foram utilizados 2,5µL de tampão 10X, 2µL de dNTPs (2,5mM), 1µL de cada primer (20pmol), 1µL de $MgCl_2$ (2mM), 1U da enzima Taq Polimerase e 2µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Swift MaxPro (Esco; Singapura) com as seguintes condições: 94°C por 30 segundos, 62°C por 15 segundos, 58°C por 15 segundos, 72ºC por 1 minuto, em um total de 30 ciclos. Após a eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo, os produtos amplificados foram analisados através da visualização da banda correspondente em transluminador de luz ultravioleta MacroVue (Pharmacia LKB Biotechnologies; Uppsala, Suécia) e da fotodocumentação digital (Alpha Innotech; San Leandro, EUA). O controle positivo do teste foi uma cepa de *S.* Enteritidis PT4 pertencente à bacterioteca do CDPA. O controle negativo para o protocolo foi uma cepa padrão de *Mannheimia haemolytica* (ATCC 29694) e o controle negativo da reação correspondeu ao conteúdo do *mix* sem a adição de DNA.

As cepas que apresentaram uma banda correspondente a 225pb foram consideradas positivas e classificadas no fagotipo 4. Amplificações que apresentaram amostras com resultados negativos foram repetidas para confirmação do resultado.

5.4.2 Resultados e discussão

O protocolo de PCR para a pesquisa do gene marcador do PT4 em cepas de *S.* Enteritidis foi capaz de detectar as cepas pertencentes a este fagotipo (Figura 1).

Figura 1 – Determinação do fagotipo PT4 em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica de PCR.



Legenda: M: marcador de peso molecular (100pb). 01 e 02: cepas de *S.* Enteritidis isoladas do campo. 03 a 05: cepas de *S.* Enteritidis isoladas de produto. 06 a 08: cepas de *S.* Enteritidis isoladas de surtos. 09: controle negativo do protocolo. 10: controle negativo da reação.

Entre as cepas avaliadas, 94,7% (142/150) foram classificadas no fagotipo PT4. Os resultados são semelhantes àqueles encontrados em estudos anteriores (SANTOS *et al.*, 2003; ALCOCER *et al.*, 2006; PANG *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007; KALENDER *et al.*, 2009; VAZ *et al.*, 2010) e aos dados oficiais do Ministério da Agricultura brasileiro (BRASIL, 2008; BRASIL, 2015a). Desde a introdução do fagotipo PT4 no Brasil em 1993, diversos estudos têm demonstrado que este fagotipo continua sendo o mais identificado na região sul do Brasil, inclusive no RS (SANTOS *et al.*, 2003; RIBEIRO *et al.*, 2007; VAZ *et al.*, 2010). O PT4 está associado à ocorrência de salmonelose em humanos (EVANS; LANE; RIBEIRO, 1998; BACK, 2010; FOOD SAFETY, 2015b), especialmente a partir do consumo de ovos contaminados (FOOD SAFETY, 2015b).

Inicialmente, a fagotipagem era uma ferramenta fundamental para diferenciação das cepas de *Salmonella* spp., mas a predominância de fagotipos específicos em determinadas regiões tornou esta técnica secundária (OLSEN *et al.*, 1993). A fagotipagem ainda é amplamente utilizada em associação com outras técnicas de diferenciação, especialmente aquelas baseadas na caracterização molecular das cepas, como a PFGE. A pesquisa do PT4 através de um método molecular alternativo à caracterização fenotípica

permite a realização de um *screening* e, mesmo que não seja possível diferenciar todos os fagotipos, permite a detecção daquele de maior prevalência em cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de aves. Além disto, a técnica de PCR consiste em uma metodologia mais rápida, menos laboriosa e de menor custo, quando comparada à fagotipagem convencional.

5.5 Experimento V - Diferenciação genética de *Salmonella* Enteritidis através da ribotipificação por PCR e do sequenciamento

5.5.1 Materiais e métodos

5.5.1.1 Ribotipificação por PCR

A ribotipificação por PCR consiste na realização da técnica de PCR utilizando-se um par de *primers* delineados para anelamento com regiões altamente conservadas dos genes ribossomais 16S e 23S. O objetivo é amplificar a região espaçadora entre estes genes, pois ela possui polimorfismos que permitem o agrupamento das cepas em ribotipos conforme o padrão de bandas obtido.

Para esta técnica foram selecionadas as 150 cepas de *S.* Enteritidis das três fontes de isolamento. A sequência dos *primers* (F: CAAGGCATCCACCGTGT | R: GTGAAGTCGTAACAAGG) foi obtida do trabalho de Oliveira *et al.* (2009), assim como as concentrações dos reagentes para o preparo do *mix* e as condições do termociclador. Para o preparo do *mix* foram utilizados 2,5µL de tampão 10X, 2µL de dNTPs (10mM), 2µL de cada primer (20pmol), 1µL de $MgCl_2$ (2mM), 1U da enzima Taq Polimerase e 2µL de DNA. A amplificação foi realizada em termociclador Swift MaxPro (Esco; Singapura) com as seguintes condições: 94°C por 15 segundos, 55°C por 4 minutos e 72º por 1 minuto, em um total de 25 ciclos. Após a eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, os produtos amplificados foram analisados através da visualização das bandas em transluminador de luz ultravioleta MacroVue (Pharmacia LKB Biotechnologies; Uppsala, Suécia) e da fotodocumentação digital (Alpha Innotech; San Leandro, EUA). Uma cepa padrão de *Mannheimia haemolytica* (ATCC 29694) foi utilizada como controle negativo do protocolo, e como controle negativo da reação o conteúdo do *mix* sem adição de DNA.

A classificação em diferentes ribotipos foi baseada no padrão de bandas obtido para cada uma das cepas e seguiu a nomenclatura descrita por Oliveira *et al.* (2009) e Oliveira *et al*. (2012). O ribotipo 1 (R1) é composto por fragmentos de aproximadamente 300, 400, 600, e 800bp, o ribotipo 2 (R2) por fragmentos de aproximadamente 400 e 600pb, e o ribotipo 3 (R3) por fragmentos de aproximadamente 400, 600 e 800pb. Novos ribotipos foram identificados em sequência. A ribotipificação foi repetida duas vezes para a confirmação do resultado obtido.

5.5.1.2 Sequenciamento

Cepas representativas dos ribotipos obtidos foram selecionadas aleatoriamente para o sequenciamento. Uma nova eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo foi realizada para secção e coleta da porção do gel que continha o fragmento de 600pb presente em todas as cepas. A purificação do DNA foi realizada utilizando-se o *kit* comercial *PureLink Quick Gel Extraction Kit* (Invitrogen; Löhne, Alemanha) conforme as recomendações do fabricante. Após, a quantificação do DNA foi realizada através da eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídeo, utilizando-se como parâmetro o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen; Löhne, Alemanha). Entre 30 e 40ng de DNA molde, além de 4,5pmol do *primer* específico e água ultrapura para completar um volume total de 6µL foram pipetados em tubos de microcentrífuga. Cada cepa foi sequenciada em duplicata.

O sequenciamento das amostras foi realizado no laboratório ACTGene Análises Moleculares do Centro de Biotecnologia (CBiot) da UFRGS, utilizando o sequenciador automático *AB 3500 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50cm e polímero POP7 (Applied Biosystems; Waltham, EUA). Os DNA-moldes foram marcados utilizando-se 2,5 pmol do *primer forward* ou 2,5 pmol do *primer reverse* e 0,5 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Standart* (Applied Biosystems; Waltham, EUA) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *LGC XP Cycler* (Bioer, Tóquio, Japão) com uma etapa de desnaturação inicial a 96ºC por três minutos, seguida de 25 ciclos de 96ºC por dez segundos, 55ºC por cinco segundos e 60ºC por quatro minutos. Depois de marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e pela lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems; Waltham, EUA), desnaturados a 95ºC por cinco minutos, resfriados em gelo por cinco minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados pelo programa *Data Collection* 2 (Applied Biosystems; Waltham, EUA) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "KB_3500_POP7_BDTv3.mob"; *BioLIMS Project* "3500_Project1"; *Run Module 1* "FastSeq50_POP7_50cm_cfv_100"; e *Analysis Module 1* "BC-3500SR_Seq_FASTA.saz"."

As sequências oriundas dos *primers forward* e *reverse* foram analisadas quanto a sua qualidade através dos eletroferogramas gerados e *contigs* construídos através do programa *Seqman Pro* do pacote *DNAStar Lasergene* (DNAStar; Madison, EUA). Após

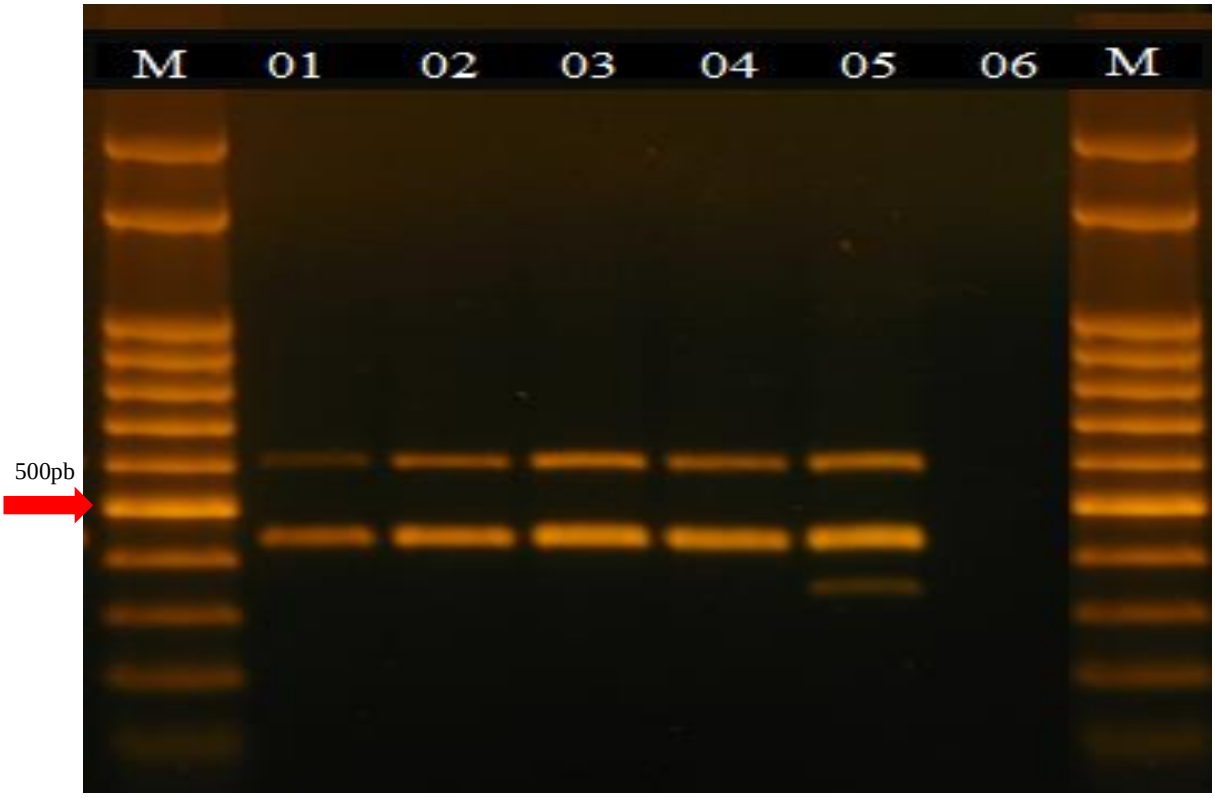
a obtenção de sequências de consenso, foi realizado o alinhamento múltiplo dos dados pelo método *Clustal W*. A inferência filogenética foi realizada através do algoritmo *Maximum Likelihood* com o modelo de substituição *General Time Reversible*, utilizando o programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA). Adicionalmente, a similaridade entre todos os possíveis pares de sequências mais próximas (*pairwise distance*) foi estabelecida através deste mesmo programa.

5.5.2 Resultados e discussão

O protocolo utilizado para a ribotipificação por PCR foi capaz de diferenciar as cepas de *S.* Enteritidis analisadas. Todas as cepas apresentaram fragmentos de 400pb e 600pb, diferenciando-se do controle negativo, *Mannheimia haemolytica* ATCC 29694, que apresentou um padrão de bandas composto por fragmentos de aproximadamente 300, 400 e 500pb. Apesar de existirem diversos métodos para diferenciação de *Salmonella* spp., a ribotipificação por PCR foi escolhida devido à facilidade de execução, ao baixo custo e por apresentar resultados semelhantes aos apresentados por outras técnicas (GEIMBA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2009). Recentemente o ECDC confirmou a PFGE como técnica padrão-ouro para se obter um maior poder discriminatório entre as cepas de *Salmonella* spp. envolvidas em surtos de salmonelose (ECDC, 2016). Um estudo publicado por Oliveira *et al.* (2009) comparou a diferenciação das cepas de *S.* Enteritidis isoladas no RS através da ribotificação por PCR e da PFGE e, embora a PFGE tenha diferenciado as cepas em um maior número de perfis, a ribotipificação por PCR demonstrou ser um método adequado para o estudo da relação epidemiológica de cepas de *S.* Enteritidis. Os mesmos resultados foram obtidos analisando-se outros grupos de cepas de *Salmonella* Enteritidis também isoladas no RS (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Entre as cepas analisadas, 98,7% (148/150) foram classificadas no padrão R2. Nenhuma cepa foi classificada nos padrões R1 e R3. Um novo padrão foi observado entre as cepas avaliadas e foi denominado de R4, com fragmentos de aproximadamente 300, 400 e 600pb. Este padrão foi encontrado em apenas 1,3% (2/150) das cepas. As duas cepas classificadas no ribotipo R4 foram isoladas do campo entre 2000 e 2001. Os ribotipos obtidos podem ser observados na Figura 2.

Figura 2 – Ribotipificação por PCR das cepas de *Salmonella* Enteritidis: ribotipos R2 e R4.



Legenda: M = marcador de peso molecular (100pb). 01 a 04 = cepas de *S.* Enteritidis com padrão de bandas R2 (fragmentos de aproximadamente 400 e 600pb). 05 = cepa de *S.* Enteritidis com padrão de bandas R4 (fragmentos de aproximadamente 300, 400 e 600pb). 06 = controle negativo da reação.

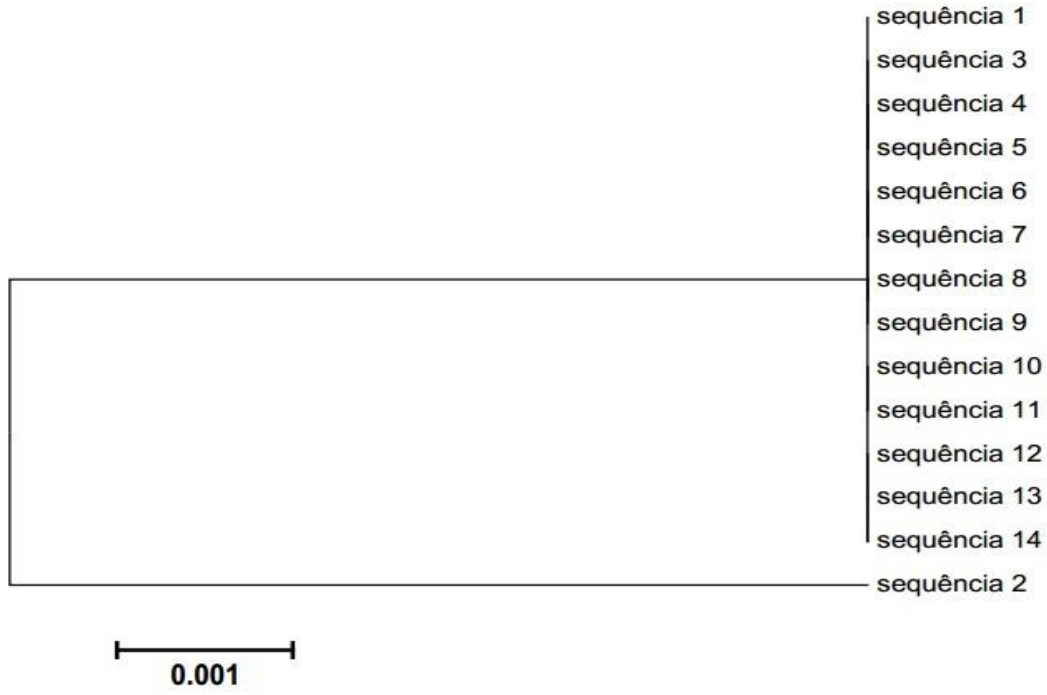
Os resultados obtidos no estudo demonstram uma alta homogeneidade entre as cepas de *S.* Enteritidis avaliadas, independentemente da origem. A baixa variabilidade genética observada na ribotipificação por PCR pode ser um indicativo de que as cepas sejam originadas de um único ancestral comum e de que exista, portanto, uma relação clonal entre elas (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

A relação clonal entre cepas de *S.* Enteritidis envolvidas em surtos de salmonelose em humanos no RS já foi observada em trabalhos anteriores. Em 2005, Geimba (2005) observou apenas dois ribotipos (R1 e R2), sendo o perfil R1 o mais frequente (97,4%) entre cepas isoladas entre 1999 e 2000 no estado. Em anos seguintes, Oliveira *et al.* (2007) e Oliveira *et al.* (2009) obtiveram resultados semelhantes ao avaliar cepas isoladas entre 1999 e 2002. Em 2012, o mesmo grupo detectou três ribotipos (R1, R2 e R3) em cepas isoladas entre 1999 e 2006. Diferentemente dos trabalhos anteriores, a distribuição entre os perfis foi mais uniforme, sendo que 47,5% das cepas foram classificadas no ribotipo R1, 33,5% no R2 e 19% no R3 (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Em 2014, Capalonga (2014)

analisou cepas isoladas entre 2007 e 2013 e detectou apenas o ribotipo R2. Estes trabalhos indicam uma forte relação clonal entre as cepas isoladas de surtos de salmonelose em humanos no RS e demonstram uma mudança nas linhagens circulantes nos últimos anos.

As duas cepas classificadas no ribotipo R4 e 12 cepas pertencentes ao ribotipo R2 foram selecionadas para o sequenciamento. Todas as cepas apresentaram alta similaridade, variando de 99,7% a 100%, e foram agrupadas em um único *cluster*. Estes resultados são similares àqueles descritos por Oliveira *et al.* (2009), que também observou pouca variação entre as cepas de *S.* Enteritidis sequenciadas. Conforme demonstrado na Figura 3, apenas uma das sequências analisadas apresentou variação em relação às demais.

Figura 3 – Árvore filogenética demonstrando a relação entre as sequências nucleotídicas das cepas de *Salmonella* Enteritidis classificadas nos ribotipos R2 e R4.



Legenda: Cepas classificadas nos ribotipos R2 (sequências 13 e 14) e R4 (sequências de 1 a 12).

Os dados obtidos a partir da ribotipificação por PCR e do sequenciamento demonstram que clones específicos ou geneticamente relacionados estão disseminados também na cadeia avícola. Resultados semelhantes, mas utilizando diferentes técnicas, foram obtidos em outras regiões do Brasil (FERNANDES, *et al.*, 2003; MARTINS *et al.*, 2006; MÜRMANN *et al.*, 2008) e também em outros países (LAGATOLLA *et al.*, 1996; MURAKAMI; HORIKAWA; OTSUKI, 1999; PANG *et al.*, 2007; ZOU; KEELARA; THAKUR, 2012; BALLESTÉ-DELPIERRE *et al.*, 2014). De acordo com Pang *et al.*

(2007), é possível que exista uma distribuição mundial de um único clone de *S.* Enteritidis.

A análise de cepas de *S.* Enteritidis isoladas de diferentes anos, origens e regiões geográficas tem demonstrado que o sorovar *S.* Enteritidis possui um alto grau de homogeneidade. Entretanto, é preciso ressaltar que a maior frequência de um clone específico não está associada com o nível de virulência da cepa, uma vez que este não é determinado pela relação clonal de *S.* Enteritidis (OLSEN; TIAINEN; BROWN, 1999). A maior ocorrência destes clones pode ser devida às limitadas recombinações ou rearranjos durante a evolução (PANG *et al.*, 2007). Em estudos futuros, sugere-se a pesquisa da relação clonal das cepas para outros sorovares, especialmente do sorovar *S.* Heidelberg.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro trabalho realizado no CDPA envolvendo a avaliação da produção de biofilmes foi desenvolvido por Rodrigues (2009) e forneceu informações importantes para a realização de novos estudos no laboratório. O atual estudo avaliou a influência dos diferentes sorovares e da fonte de isolamento da cepa na produção de biofilme. Os resultados obtidos fornecem informações para futuros estudos. Observou-se que as cepas de *Salmonella* spp. possuem a habilidade de produzir biofilme, com diferentes graus de adesão, em superfícies de poliestireno a 37ºC, 28ºC, 12ºC e 3ºC. Observou-se que todos os sorovares foram capazes de formar biofilme nesta superfície e que a origem das cepas não influencia na capacidade das cepas em produzir estas estruturas. Os dados obtidos indicam uma tendência de que a produção de biofilme seja cepa-dependente, isto é, que as características intrínsecas das cepas determinem o seu potencial em formar estas estruturas. Entretanto, os padrões de regulação da formação de biofilmes por cepas de *Salmonella* spp. são muito complexos e é necessária a continuidade dos estudos relacionados ao tema.

O monitoramento da resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp. contribui para a discussão sobre o emprego de antimicrobianos na produção animal e seus impactos na seleção de cepas resistentes. Os resultados obtidos no teste fenotípico destacam a importância das fontes avícolas como reservatório de cepas com resistência a uma ou mais substâncias. Estes dados também reforçam a necessidade da implementação de estratégias alternativas para a prevenção de enfermidades, especialmente quando se considera a grande lacuna de tempo desde o último antimicrobiano desenvolvido. Os resultados obtidos nos testes moleculares para pesquisa de genes associados à resistência sugerem que devem ser realizadas investigações contínuas sobre os elementos genéticos que causam a resistência, além dos testes fenotípicos que são usualmente realizados nos programas de monitoramento da resistência bacteriana. Estas investigações são úteis no entendimento da origem e da disseminação da multirresistência bacteriana, além de auxiliar na determinação do impacto em saúde pública.

A caracterização das cepas de *Salmonella* spp. através da pesquisa de genes associados à virulência demonstrou que o padrão de frequência de praticamente todos os genes foi semelhante. Entretanto, foi possível identificar genes que estão associados com a fonte de isolamento da cepa ou com o sorovar. Esta associação pode indicar características específicas da cepa conforme o seu sorovar ou a sua origem, a qual deve

ser ratificada por estudos que analisem a expressão gênica *in vitro* e *in vivo*. Atualmente, o desafio é descobrir como e quais são as aquisições genéticas que conferem os mais importantes traços de virulência, assim, interferindo na patologia e na especificidade do hospedeiro.

Observou-se que não existe relação ($p<0,05$) entre a produção de biofilme e a resistência antimicrobiana das cepas, assim como citado anteriormente (GONG *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013; GHASEMMAHDI *et al.*, 2015; PIRAS *et al.*, 2015). Entretanto, alguns resultados merecem destaque, mesmo que não sejam estatisticamente significantes. Observou-se que 44,1% (15/34) das cepas multirresistentes foram capazes de formar biofilme, sendo 23,5% (8/34) de forma moderada ou forte. Além disto, algumas das cepas multirresistentes e com alta capacidade de formação de biofilme foram classificadas como altamente patogênicas através da inoculação experimental em pintos de corte realizada previamente por Lima (2014) em nosso laboratório. Os genes *spiA* e *agfA* estão relacionados com a habilidade das cepas em produzir biofilmes. Entre as cepas analisadas, 98,2% apresentaram o gene *agfA*, e 93,4% o gene *spiA*. Apesar da alta frequência, *spiA* e *agfA* não apresentaram associação significativa ($p>0,05$) com a produção destas estruturas. Apesar de a maior parte das cepas apesentarem o gene, provavelmente apenas algumas delas irão expressá-lo. Também foi observado que não existe relação ($p>0,05$) entre os demais genes de virulência pesquisados e a capacidade de produção de biofilme das cepas.

7 CONCLUSÕES

- A maioria das cepas de *Salmonella* spp. avaliadas possuem capacidade de produzir biofilmes em placas de poliestireno a 37ºC. As cepas apresentaram comportamentos distintos nas diferentes temperaturas de incubação, demonstrando que há forte influência da temperatura na produção de biofilme. A produção destas estruturas não está associada à origem de isolamento da cepa, mas está parcialmente associada aos sorovares.
- As maiores resistências antimicrobianas observadas, independentemente do sorovar e da origem de isolamento da cepa, foram para sulfafurazol, ciprofloxacina, enrofloxacina e tetraciclina. Observou-se que a resistência a alguns antimicrobianos está associada ao sorovar e à fonte de isolamento da cepa. Aproximadamente 14% das cepas foram classificadas como multirresistentes, sendo a maioria delas de origem avícola.
- Os genes de resistência antimicrobiana mais frequentes nas cepas multirresistentes foram *tet*(A), *aadA* e *cmlA*.
- A maioria dos genes de virulência pesquisados apresentou frequência superior a 90%. Os genes de virulência estão distribuídos entre os sorovares e entre as cepas de diferentes origens de forma uniforme. Entretanto, alguns genes estão associados com o sorovar e outros estão relacionados com a fonte de isolamento da cepa. Os genes *spaN* e *iroN* são possíveis marcadores de origem, enquanto que *sefA*, *sopE* e *lpfA* são possíveis marcadores de sorovar.
- Aproximadamente 95% das cepas de *S.* Enteritidis pertencem ao fagotipo 4 (PT4).
- Aproximadamente 99% das cepas de *S.* Enteritidis foram classificadas no ribotipo R2. Este resultado, confirmado pelo sequenciamento, indica a propagação de clones geneticamente idênticos ou com alta similaridade entre as cepas de *S.* Enteritidis circulantes em humanos e em animais em uma mesma área geográfica.

REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Annual ABPA 2015. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. 248p. 2015.

ABRAHAM, S. *et al*. *Salmonella enterica* isolated from infections in Australian livestock remain susceptible to critical antimicrobials. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 2, p. 126-130, Feb. 2014.

AGARWAL, R.K. *et al.* Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 4, p. 1493-1498, Nov. 2011.

AHMED, R. *et al.* Epidemiologic Typing of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in a Canada-Wide Outbreak of Gastroenteritis due to Contaminated Cheese. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2403-2406, June 2000.

AKIYAMA, T. *et al.* Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul isolated from imported seafood, pepper, environmental and clinical samples. **Food Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 1124-1128, Sep. 2011.

ALCOCER, I. *et al.* Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteriditis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 414-420, abr./jun. 2006.

ALMEIDA, R.T.; PALERMO-NETO, J. Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de resistência bacteriana. *In*: PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIAK, S.L. (Ed.). **Farmacologia aplicada à avicultura**. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2005. cap. 10, p. 161-173.

ALTEKRUSE, S *et al.* A comparison of *Salmonella* Enteritidis phage types from egg-associated outbreaks and implicated laying flocks. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 1, p. 17-22, Feb. 1993.

ÁLVAREZ, N.M. **Virulencia, resistência y elementos genéticos móviles en serotipos no prevalentes de *Salmonella enterica***. 2007. 156 f. Tese (Doutorado em Biología Funcional) - Universidad de Oviedo, Oviedo, 2007.

AMINI, K. *et al.* Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 21, p. 2202-2210, Dec. 2010.

ANDREATTI, R.L. Panorama da *Salmonella* spp. na América do Sul. *In*: AVISULAT – CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE AVICULTURA, SUINOCULTURA E LATICÍNIOS, 4, 2014, Bento Gonçalves. **Palestras**. Bento Gonçalves: ASGAV, SIPS E SINDILAT/RS, 2014.

ÂNGULO, F.J. *et al*. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 78-85, Apr. 2004.

ANTONINI, S.R.C.; MENEGHIN, S.P.; URASHIMA, A.S. **Técnicas Básicas de Biologia Molecular**. 2004. **Apostila** (Disciplina de Biologia Molecular) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2004.

ANTUNES, P. *et al*. Dissemination of sulfonamide resistance genes (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) in Portuguese *Salmonella enterica* strains and relation with integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 836-839, Feb. 2005.

APEL, D. *et al.* Long-Term Survival of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Reveals an Infectious State That Is Underrepresented on Laboratory Media Containing Bile Salts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 14, p. 4923-4925, July 2009.

AUSTIN. J.W. *et al.* Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, n. 2, p.295-301, May 1998.

AVEWORLD. Frango Brasil vence a crise! **AveWorld**. Ed. 76, ano 13, out./nov. 2015.

AVICULTURA INDUSTRIAL. Anuário 2016 da Avicultura Industrial. **Avicultura Industrial**, n. 11, ano 107, Ed. 1250, 2015.

BACK, A. Salmoneloses. *In*: _____ (Ed.). **Manual de Doenças de Aves**. 2. ed. Cascavel: Editora Integração, 2010, cap. 2.16, p.174-192.

BAKKER, H.C.D. *et al.* Genome sequencing reveals diversification of virulence factor content and possible host adaptation in distinct subpopulations of *Salmonella enterica*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 425, p. 1-11, Aug. 2011.

BALLESTÉ-DELPIERRE, C. *et al.* Molecular study of quinolone resistance mechanisms and clonal relationship of *Salmonella enterica* clinical isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 2, p. 121-125, Feb. 2014.

BARMAN, G. *et al.* Detection of virulence genes of *Salmonella* by polymerase chain reaction. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 83, n. 5, p. 477-480, 2013.

BARROW, P.A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. *Salmonella*. *In*: GYLES, C.L *et al.* (Ed.). **Pathogenesis of bacterial infections in animals**. 4.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. cap. 14, p. 231-266.

BÄUMLER, A.J. *et al.* Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operon during evolution of *Salmonella* serotypes. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 317-322, Jan. 1997.

BÄUMLER, A.J. *et al.* IroN, a Novel Outer Membrane Siderophore Receptor Characteristic of *Salmonella enterica*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 6, p. 1446-1453, Mar. 1998.

BÄUMLER, A.J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 2087-2097, Apr. 1995.

BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiological Reviews**, v. 26, n. 2, p. 185-230, Apr. 2013.

BEEF POINT. Produção brasileira de carne de frango atinge 12,691 milhões de toneladas em 2014. **Beef Point.** Disponível em: < http://www.beefpoint.com.br/>. Acesso em: 14 abr. 2014.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A.N. A evolução da avicultura industrial e seus efeitos territoriais. **Revista Percurso – NEMO**, v. 2, n. 1, p. 25-51, 2010.

BEN ABDALLAH, F. *et al.* Detection of Cell Surface Hydrophobicity, Biofilm and Fimbirae Genes in *Salmonella* Isolated from Tunisian Clinical and Poultry Meat. **Iranian Journal of Public Health**, v. 43, n. 4, p. 423-431, Apr. 2014.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses. *In*: BERCHIERI JÚNIOR, A. *et al.* (Ed.). **Doenças das Aves.** 2. ed. Campinas: FACTA, 2009. cap. 4.1, p. 435-454.

BETANCOR, L. *et al.* Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1155-1162, Mar. 2004.

BOKRANZ, W. *et al.* Expression of cellulose and curli fimbriae by *Escherichia coli* isolated from the gastrointestinal tract. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, pt. 12, p. 1171-1182, Dec. 2005.

BORGES, K.A. *et al.* Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p. 1416-1422, Dec. 2013.

BORSOI, A. *et al.* Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v. 88, n. 4, p. 750-758, Apr. 2009.

BORSOI, A.; FRANÇA, J.M.; GONSALVES, C.C. *Salmonella* na avicultura e sua importância em saúde pública. **Revista eletrônica: biociências, biotecnologia e saúde**, n. 1, jan/abr. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frangos congeladas comercializadas no Brasil. Brasília, 2008. 188p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frangos congeladas comercializadas no Brasil. Brasília, 2012. 171p. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 7 dez. 2015a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resistência microbiana – mecanismos e impacto clínico. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramn_lacta4.htm>. Acesso em: 5 out. 2015b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°08. Programa de Controle de Resíduos e Contaminantes em Carnes PNCRC/2010. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 29 abr. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 09. Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso de princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham esses princípios ativos, para uso veterinário e susceptível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 27 jun. 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 11. Proibir a fabricação, a importação, a comercialização e o uso da substância química olaquindox, como aditivo promotor de crescimento em animais produtores de alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 nov. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 14. Proíbe em todo território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 mai. 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 26. Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 09 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 35. Proibe a fabricação, a importação, a comercialização e o uso de produtos destinados à alimentação animal contendo a substância química denominada carbadox. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 nov. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n° 210. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 nov. 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças Transmitidas por Alimentos - 2015. Disponível em: <http://u.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>. Acesso em: 02 dez. 2015c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Vigilância em Saúde. Relatório de Situação: Rio Grande do Sul. 2011. 34p.

BRASIL ECONÔMICO. Agronegócio pode ser a exceção positiva na economia em 2015. **Brasil Econômico.** Disponível em: < http://brasileconomico.ig.com.br/>. Acesso em: 14 abr. 2015.

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

CABARKAPA, I. *et al.* Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. **Acta Veterinaria-Beograd**, v. 65, n. 3, p. 371-389, Sep. 2015.

CAILHOL, J. *et al.* Trends in antimicrobial resistance phenotypes in non-typhoid Salmonellae from human and poultry origins in France. **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 1, p. 171-178, Feb. 2006.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.; FALCÃO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 254-264, Dec. 2012.

CAPALONGA, R. **Estudo das características fenotípicas e genotípicas das *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos alimentares no estado do Rio Grande do Sul no período de 2007 a 2013**. 2014. 67 F. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

CARLSON, S.A. *et al.* Detection of multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 using multiplex and fluorogenic PCR. Molecular and Cellular Probes, v. 13, n. 13, p. 213-222, June 1999.

CARPENTIER, B., CERF, O. Biofilm and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p.499-511, June 1993.

CASTELANI, L.; DUARTE, K.M.R. Métodos moleculares em microbiologia de alimentos. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 5, n. 2, p. 999-1004. 2011.

CASTELIJN, G.A.A. *et al.* Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and low nutrient medium. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, v. 28, n. 1, p. 51-63, 2012.

CASTELIJN, G.A.A. *et al.* Surface behaviour of *S.* Typhimurium, *S.* Derby, *S.* Brandenburg and *S.* Infantis. **Veterinary Microbiology**, v. 161, n. 3-4, p. 305-314, Jan. 2013.

CASTILLA, K.S. *et al.* Distribution of virulence genes sefC, pefA e spvC in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 135-139, Apr./June 2006.

CCFH (Codex Committee on Food Hygiene). Working Group on Guidelines for control of *Campylobacter* and *Salmonella* spp. in broiler (young bird) chicken meat. Food Safety Risk Profile for *Salmonella* species in broiler (young) chickens. **CCFH**. 30p. 2007.

CDC (Center for Disease Control). CDC 2011 Estimates: Findings. **CDC**. Disponível em: < http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>. Acesso em: 5 jan. 2016.

CDC (Center for Disease Control). Making Food Safer to Eat: Reducing contamination from the farm to the table. **CDC**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/vitalsigns/foodsafety/>. Acesso em: 18 mar. 2013.

CDC (Center for Disease Control). Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant Salmonella Heidelberg Infections Linked to Foster Farms Brand Chicken. **CDC**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-10-13/>. Acesso em: 6 maio 2015.

CDC (Center for Disease Control). *Salmonella*. **CDC**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em: 17 mar. 2014.

CHARLTON, B.R. *et al.* Salmonellosis. **Avian Disease Manual.** 6. ed. Georgia: American Association of Avian Pathologists, 2006. p. 106-114.

CHAUDHARY, J.H. *et al.* Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. **Veterinary World**, v. 8, n. 1, p. 121-124, Jan. 2015.

CHENG, A.C. *et al.* Control of Fluoroquinolone Resistance through Successful Regulation, Australia. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 18, n. 9, p. 1453-1460, Sep. 2012.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 2, n. 1, p. 23-32, Nov. 2006.

CHRISTENSEN, H. *et al.* Sequence variation of the 16S to 23S rRNA spacer region in *Salmonella enterica*. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 37-42, Jan./Feb. 2000.

CIPARS. Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance. Annual Report – Chapter 2. Antimicrobial Resistance. **Public Health Agency of Canada**, 2013. 116p.

CLOUTHIER, S.C. *et al.* Characterization of three fimbrial genes, *sef*ABC, of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology,** v. 175, n. 9, p. 2523-2533, May 1993.

CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests – Twenty-Third information supplement. **M100-S23**, v. 33, n. 1, 2013. 205p.

CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. **CLSI M31-A3**, v. 28, n. 8, 2008. 116p.

CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests for bacteria isolated from animals. **VET01-A4**, v. 33, n. 7, 2014a. 94p.

CLSI (Clinical and Laboratorial Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility tests for bacteria isolated from animals – Second information supplement. **VET01-S2**, v. 33, n. 8, 2014b. 74p.

COLLIGNON, P. Antibiotic resistance in human *Salmonella* isolates are related to animal strains. **Proceedings of the Royal Society: Biological Sciences**, v. 279, n. 1740, p. 2922-2923, Aug. 2012.

COLLIGNON, P. Fluoroquinolone Use in Food Animals. **Emerging Infectious Diseases Journal**, v. 11, n. 11, p. 1789-1792, 2005.

COLLINSON, S.K. *et al.* Thin aggregative fimbriae from Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4490–4495, July 1992.

CORCORAN, M. *et al.* Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. Applied and Environmental Microbiology, v. 80, n. 4, p. 1507-1514, Feb. 2014.

CORCORAN, M. *et al. Salmonella enterica* Biofilm Formation and Density in the Centers for Disease Control and Prevention's Biofilm Reactor Model Is Related to Serovar and Substratum. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 662-667, Apr. 2013.

COSTERTON, J.W. *et al.* Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p.711-745, 1995.

COSTERTON, J.W.; STEWART, P.S.; GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 21, n. 284, p. 1318-22, May 1999.

CRACIUNAS, C. *et al.* DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hilA, agfA, spvC* and *sef* genes. **Journal of Environmental Management**, v. 95, p. 15-18, Mar. 2012.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 405-428, July 1999.

DERAKHSHANDEH, A.; FIROUZI, R.; KHOSHBAKH, R. Association of Three Plasmid-Encoded *spv* Genes Among Different *Salmonella* Serotypes Isolated from Different Origins. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 106-111, Jan./Mar. 2013.

DÍEZ-GARCÍA, M.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. **Food Microbiology**, v. 31, p. 173-180, Apr. 2012.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Reviews, v. 15, n. 2, p. 167-93, Apr. 2002.

DORAN, J.L. *et al*. Diagnostic potential of sefA DNA probes to *Salmonella* Enteritidis and certain other O-serogroup D1 *Salmonella* serovars. **Molecular and Cellular Probes**, v. 10, n. 4, p. 233-246, Aug. 1996.

DORAN, J.L *et al.* DNA-based diagnostic test for *Salmonella* species targeting *agf*A, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 9, p. 2263-2273, Sep. 1993.

DOUADI, B. *et al.* Characterization of Drug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium by Antibiograms, Plasmids, Integrons, Resistance Genes, and PFGE. **Jounal of Microbiology Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 1042-1052, June 2010.

DOUBLET, B. *et al*. Florfenicol Resistance Gene floR is Part of a Novel Transposon. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 2106-2108, May 2005.

ECDC (European Center for Disease Prevention and Control). Fourth external quality assessment scheme for *Salmonella* typing. **ECDC – Technical Report**. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/salmonella-external-quality-assessment-EQA-scheme-for-typing-2013.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2016.

ECDC (European Center for Disease Prevention and Control). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. **ECDC Food- and waterborne diseases and zoonoses**. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-zoonoses-food-borne-outbreaks-2012.pdf >. Acesso em: 14 jul. 2015a.

ECDC (European Center for Disease Prevention and Control). Zoonoses**. ECDC Food- and waterborne diseases and zoonoses**. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/food_and_waterborne_disease/Documents/Zoonose%202014_SCREEN.pdf>. Acesso em: 14 jul. 2015b.

ECHEITA, M.A *et al*. Multiplex PCR-based detection and identification of the most common *Salmonella* second-phase flagellar antigens. **Research in Microbiology**, v. 153, n. 2, p. 107-113, Mar. 2002.

EFSA (European Food Safety Authority). *Salmonella*. **EFSA Topics**. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella.htm>. Acesso em: 20 mai. 2015.

EFSA (European Food Safety Authority); ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. **EFSA Journal**, v. 13, n. 2, s. 4036, 178p. 2015.

ELEMFAREJI, O.I.; THONG, K.L. Comparative Virulotyping of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Enteritidis. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 410-417, Oct./Dec. 2013.

EMBL-EBI. *Salmonella* invasion protein InvJ (IPRO003060). **InterPro.** 2016. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPRO003060>. Acesso em: 15 fev. 2016.

EVANS, M.R.; LANE, W.; RIBEIRO, D. *Salmonella* Enteritidis PT6: Another Egg-Associated Salmonellosis? **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 4, p. 667-669, Oct./Dec. 1998.

FDA (Food and Drug Administration). 2013 Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. **FDA: Department of Health and Human Services**. 57p. Apr. 2015.

FERNANDES, S. *et al.* 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. 2, p. 59-63, mar./abr. 2003.

FIELDS, P. *Salmonella* serotyping. *In*: ANNUAL PULSENET UPDATE MEETING, 10, 2006, Miami. **Palestras**. Miami: National *Salmonella* Reference Lab – CDC, 2006.

FOLEY, S.L.; LYNNE, A.M. Food animal associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 14, p. 173-187, Apr. 2008.

FOLEY, S.L.; ZHAO, S.; WALKER, R.D. Comparison of Molecular Typing Methods for the Differentiation of *Salmonella* Foodborne Pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 3, p. 253-276, 2007.

FOOD SAFETY. 62 Percent of 2013 Animal Antibiotics Sales Were Medically Important Drugs. **Food Safety**. Disponível em: <www.foodsafetynews.com/2015/04/62-percent-of-2013-animal-antibiotics-sales-were-medically-important-drugs/#.VTonriFVikp>. Acesso em: 24 abr. 2015a.

FOOD SAFETY. *Salmonella*. **Food Safety**. Disponível em : <www.foodsafetywatch.org/factsheets/salmonella/>. Acesso em: 26 ago. 2015b.

FOOD SAFETY. The Search for Alternatives to Antibiotics. **Food Safety**. Disponível em: <http://www.foodsafetynews.com /2014/11/the-search-for-alternatives-to-antibiotics/#.VToz8CFViko>. Acesso em: 24 abr. 2015c.

FORSHELL, L.P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 25, n. 2, p. 541-554, Aug. 2006.

FREUDENBERG, M.A.; MERLIN, T.; SING, A.; GALANOS, C.; SALOMÃO, R. Bacteria-induced hypersensitivity to endotoxin. **Innate Imunity,** v. 5, n. 4, p. 231-238, 1999.

FRYE, J.G.; JACKSON, C.R. Genetic mechanisms of antimicrobial resistance identified in *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, and *Enteroccocus* spp. isolated from U.S. food animals. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1-22, May 2013.

GALDINO, V.M.C.A. *et al.* Virulência de *Salmonella* spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 4, p. 932-939, July/Aug. 2013.

GAL-MOR, O. ***Salmonella enterica.*** The Infectious Disease Research Laboratory – Sheba Medical Center, Israel. **Sheba**. Disponível em: < http://eng.sheba.co.il>. Acesso em: 5 dez. 2010.

GAST, R.K. Detecting infections of chicken with recent *Salmonella* Pullorum isolates using standard serological methods. **Poultry Science**, v. 76, n. 1, p. 17-23, Jan. 1997.

GAST, R. K. *Salmonella* infections – Paratyphoid Infections. *In*: SAIF, Y.M. (Ed.). **Disease of Poultry.** 12. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. cap. 16, p. 636-665.

GEBREYES, W.A.; ALTIER, C. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 8, p. 2813-2822, Aug. 2002.

GEIMBA, M.P. **Caracterização fenotípica e genotípica de linhagens de *Salmonella* spp. envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul nos anos de 1999 a 2000**. 2005. 114 F. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

GERSTEL, U.; ROMLING, U. Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella* Typhimurium. **Environmental Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 638-648, Oct. 2001.

GIBSON, D.L. *et al. agfC* and *agfE* facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 1131-1140, Apr. 2007.

GONCAGÜL, G.; GÜNAYDIN, E.; ÇARLI, K.T. Antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis of human and chicken origin. **Turkish Journal of Veterinary & Animal**, v. 28, p. 911-914, 2004.

GRAVE, K.; TORREN-EDO, J.; MACKAY, D. Comparison of the sales of veterinary antibacterial agents between 10 European countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 2037-2040, Sep. 2010.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*.** Pasteur Institute, France. 2007.

GROISMAN, E.A.; OCHMAN, H. Pathogenicity Islands: Bacterial Evolution in Quantum Leaps. **Cell**, v. 87, n. 5, p. 791–794, Nov. 1996.

GUIBOURDENCHE, M. *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26-29, Jan./Feb. 2010.

GUILLAUME, G. *et al.* PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 1, p. 77-85, Apr. 2000.

GUO, X. *et al.* PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hilA*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5248-5252, Dec. 2000.

GÜRTLER, V.; MAYALL, B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary**, v. 51, n. 1, p. 3-16, Jan. 2001.

HACKER, J.; CARNIEL, E. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity – A Darwian view of the evolution of microbes. **European Molecular Biology Organization**, v. 2, n. 5, p. 376-381, Mar. 2001.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 1034–1043, Apr. 2009.

HEITHOFF, D.M. *et al.* Human *Salmonella* Clinical Isolates Distinct from Those of Animal Origin. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 1757–1766, Mar. 2008.

HELMUTH, R.; SCHROETER, A. Molecular typing methods for *S.* Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 1-2, p. 69-77, Jan. 1994.

HOPKINS, K.L.; THRELFALL, E.J. Frequency and polymorphism of *sopE* in isolates of *Salmonella enterica* belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 539–543, June 2004.

HUNG, C.S.; HENDERSON, J.P. Emerging Concepts of Biofilms in Infectious Diseases. **Missouri Medicine**, v. 106, n. 4, p. 292-296, July/Aug. 2009

IRINO, K. *et al.* Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo state, Brazil. **Revista do Institudo de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 193-196, maio/jun. 1996.

JANAKIRAMAN, A.; SLAUCH, J.M. The putative iron transport system *SitABCD* encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella* Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 5, p. 1146–1155, Mar. 2000.

JAY, J. M. Gastrenterites de Origem Alimentar causadas por *Salmonella* e *Shigella*. *In:* _____ **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1, cap. 26, p. 543-563.

JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid Identification of Bacteria on the Basis of Polymerase Spacer Polymorphisms Chain Reaction-Amplified Ribosomal DNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 4, p. 945-952, Apr. 1993.

JONG, H.K. *et al.* Host-pathogen interactions in invasive Salmonellosis. **PLOS Pathogens**, v.8, n.10, p. 1-5, Oct. 2012.

JOO, H.S.; OTTO, M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial Pathogens. **Chemistry; Biology**, v. 19, n. 12, p. 1503–1513, Dec. 2012.

JORGENSEN, J.H.; FERRARO, M.J. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Review of General Principles and Contemporary Practices. **Clinical Infectious Disease**, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, Dec. 2009.

KALENDER, H. *et al.* Antimicrobial Susceptibilities, Phage Types, and Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis from Chickens and Chicken Meat in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 3, p. 265-271, Apr. 2009

KARASOVA *et al.* Influence of 5 major Salmonella pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **BMC Microbiology**, v. 10, n. 75, p. 1-11, Mar. 2010.

KEMPF, I. *et al.* Effect of in-feed paromomycin supplementation on antimicrobial resistance of enteric bacteria in turkeys. **Veterinary Journal**, v. 198, n. 2, p. 398-403, Nov. 2013.

KEYES, K. *et al.* Detection of florfenicol resistance genes in *Escherichia coli* isolated from sick chickens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 421-424, Feb. 2000.

KINGSLEY, R.A. *et al.* Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. **Infections and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 629-640, Feb. 2003.

KLEIN, J.R.; FAHLEN, T.F.; JONES, B.D. Transcriptional organization and function of invasion genes within *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Pathogenicity Island 1, including *the prgH, prgI, prgJ, prgK, orgA, orgB,* and *orgC* genes. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 6, p. 3368–3376, June 2000.

KOBAYASHI, R. Resistência Antimicrobiana. *In*: CURSO DE SANIDADE AVÍCOLA, 2015, Porto Alegre. **Palestras**. Porto Alegre: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, IPVDF, 2015.

KOLUMAN, A.; DIKICI, A. Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: Status quo and global trends. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 57-69, Feb. 2013.

KOZAK, G.K. *et al*. Distribution of Sulfonamide Resistance Genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* Isolates from Swine and Chickens at Abattoirs in Ontario and Québec, Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 18, p. 5999-6001, Sep. 2009.

KRAUSE, M.; FANG, F.C.; GUINEY, D.G. Regulation of plasmid virulence gene expression in *Salmonella* Dublin involves an unusual operon structure. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 13, p. 4482-4489, July 1992.

KRAWIEC, M. *et al.* Prevalence and genetic characteristics of *Salmonella* in free-living birds in Poland. **BMC Veterinary Research**, v. 31, p. 11-15, Jan. 2015.

KREMPELS, D. Culture and Sensitivity Testing. Disponível em: <www.bio.miami.edu/hare/culture.html>. Acesso em: 3 mar. 2015.

KRIETSCH, K. Emerging pathogens: antibiotic resistance slowly growing in *Salmonella*. **Food Safety**. Disponível em: <http://www.foodsafetynews.com/2013/09/antibiotic-resistance-slowly-growing-in-salmonella/#.UzAcW_ldVyw>. Acesso em: 24 mar. 2014.

LACONCHA, I. *et al.* Characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 155-165, June 2000.

LAGATOLLA, C. *et al.* PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 10, p. 2440-2443, Oct. 1996.

LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 73-84, Jan. 2003.

LERTWORAPREECHA, M.; SUTTHIMUSIK, S.; TONTIKAPONG, K. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Isolated From Chicken, and Vegetables in Southern Thailand. **Jundishapur Journal of Microbiology**. v. 6, n. 11, p. 36-41, Dec. 2013.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K.P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 2, p. 171–178, Nov. 2012.

LIEBANA, E. *et al.* Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4450–4456, Dec. 2002.

LIMA, D.A. **Estabelecimento de um índice de patogenicidade em amostras de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium inoculadas em pintos de um dia de idade**. 2014. 70 F. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

LING, J.M. Rapid detection of food-borne pathogens in clinical specimens, food and environmental samples. **Hong Kong Medical Journal**, v. 15, n. 2, p. 26-29, Feb. 2009.

LOPES, G.V. **Caracterização de determinantes de resistência a antimicrobianos em isolados de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* provenientes da cadeia produtiva de suínos no sul do Brasil. 2014**. 181 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MACHINSKI JÚNIOR, M. *et al.* Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná. **PAMvet-PR**, 2005. 24p.

MADIGAN, M.T. *et al.* Princípios de Genética Bacteriana. *In*: _____ (Ed.). **Microbiologia de Brock.** 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 7, p.278-283.

MAGIORAKOS, A.P. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiological Infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, Mar. 2012.

MAKA, L. *et al.* Resistance to Sulfonamides and Dissemination of sul Genes Among Salmonella spp. Isolated from Food in Poland. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, n. 5, p. 383-389, May 2015.

MARIN, C.; HERNANDIZ, A.; LAINEZ, M. Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. **Poultry Science**, v. 88, n. 2, p. 424-431, Feb. 2009.

MARSHALL, B.M.; LEVY, S.B. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 718-733, Oct. 2011.

MARTINS, C.H.G. *et al.* Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 1, p.19-23, fev. 2006.

MATTIELO, S.P. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* strains isolated from Brazilian poultry production. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 108, n. 5, p. 1227-1238, Nov. 2015.

MEAD, P.S. *et al.* Food-Related Illness and Death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 607-625, Sept./Oct. 1999.

MEZAL, E.H. *et al.* Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. **Food Microbiology**, v. 38, p. 67-74, Apr. 2014.

MEZAL, E.H.; BAE, D.; KHAN, A.A. Detection and functionality of the CdtB, PltA, and PltB from *Salmonella enterica* serovar Javiana. **Pathogens and Disease**, v. 72, n. 2, p. 95-103, Nov. 2014.

MEZAL, E.H.; STEFANOVA, R.; KHAN, A.A. Isolation and molecular Characterization of *Salmonella enterica* sorovar Javiana from food, environmental and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 1, p. 113-118, Jun. 2013.

MIKO, A. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1025-1033, Dec. 2005.

MIRMOMENI, M.H.; KIANI, S.; SISAKHTNEZHAD, S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the *sopE* gene and its cloning. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 11, p. 1497-1501, June 2008.

MIROLD, S. *et al.* Isolation of a temperate bacteriophage encoding the type III effector protein SopE from an epidemic *Salmonella* Typhimurium strain. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 96, n. 17, p. 9845-9850, Aug. 1999.

MURAKAMI, K.; HORIKAWA, K.; OTSUKI, K. Epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis from human outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, n. 4, p. 439-442, Apr. 1999.

MÜRMANN, L. *et al.* Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 529-534, July-Sept. 2008.

NAKANO, M. *et al. Salmonella* enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 4, p. 515-521, July 2012.

NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria). Human Isolates Final Report – 2013. **CDC**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. 2015. 81p.

NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria). Retail Meat Annual Report – 2011. **FDA & CDC**. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. 2011. 82p.

NAVES, P. *et al.* Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, n. 2, p. 86-91, Aug. 2008.

NESSE, L.L. *et al.* Molecular analyses of *Salmonella enterica* isolates from fish feed factories and fish feed ingredients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1075–1081, Feb. 2003.

NOGRADY, N. *et al.* Chloramphenicol resistance genes in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from human and animal sources in Hungary. **Veterinary Medicine - Czech**, v. 50, n. 4, p. 164-170, 2005.

NGUYEN, H.D.N.; YANG, Y.S.; YUK, H.G. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 383-388, Jan. 2014.

NSRL (National *Salmonella* Reference Laboratory). Phage Typing. **National *Salmonella, Shigella* & *Listeria* Reference Laboratory (NSSLRL)**. 2015. Disponível em: <http://www.nuigalway.ie/research/salmonella_lab/phage_typing.html>. Acesso em: 10 mar. 2015

NUNES, I.A. *et al.* Phage typing of *Salmonella* Enteritidis form different sources in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 2, p. 324-327, Feb. 2003.

OLIVEIRA, D.C.V. **Produção de biofilme por *Salmonella* sp. isolada de frango**. 2011. 83 F. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2011.

OLIVEIRA, D.C.V. *et al.* Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, n. 6, p. 478-483, June 2014.

OLIVEIRA, F.A. *et al*. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**, v. 20, n. 6, p. 606-610, June 2009.

OLIVEIRA, F.A. *et al.* Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 1000-1003, Mar. 2012.

OLIVEIRA, F.A. *et al*. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 1, n. 2, p. 170-176, 2007a.

OLIVEIRA, K. *et al.* Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella* Enteritidis serotypes to materials used in kitchens. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 10, p. 2352-2356, Oct. 2006.

OLIVEIRA, S.D. *et al.* Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**. v. 97, p. 297-305, Jan. 2005.

OLIVEIRA, S.D. *et al.* Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 25–35, June 2002.

OLIVEIRA, S.D. *et al.* Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 123-124, Nov. 2003.

OLIVEIRA, S.D. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 4, p. 720-728, Oct./Dec. 2007b.

OLSEN, J. E. *et al.* Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis applications in investigations of salmonellosis among livestock. **Veterinary Quarterly**, v. 15, n. 4, p. 125-135, Dec. 1993.

OLSEN, J.E. *et al.* Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 15-22, Jan. 1994.

OLSEN, J.E.; TIAINEN, T.; BROWN, D.J. Levels of virulence are not determined by genomic lineage of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains. **Epidemiology and Infection**, v. 123, n. 3, p. 423-430, Dec. 1999.

PANDE, V.V. *et al.* Antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* isolates from egg layer flocks and egg shells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 23-26, June 2015.

PANG, J.C. *et al.* A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 305-312, May 2007.

PATCHANEE, P. *et al.* Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolated from Humans and Animals. **Foodborne Pathogens Disease**, v. 5, n. 6, p. 839-851, Dec. 2008.

PAVLIC, M.; GRIFFITHS, M.W. Principles, Applications, and Limitations of Automated Ribotyping as a Rapid Method in Food Safety. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 6, n. 9, p. 1047-1055, Nov. 2009.

PEÑA, S.T. Biofilms and their impact on food industry. **Visavet Outreach Journal**. Disponível em: < https://www.visavet.es/en/articles/biofilms-impact-food-industry.php>. Acesso em: 20 jun. 2015.

PERRY, M.B. Some structural aspects of the antigenic o-polysaccharide components of *Salmonella* somatic lipopolysacharides. In: CABELLO, F. *et al.* (Ed.) **Biology of *Salmonella,*** 1.ed. New York: Plenum Press, 1993. p. 63-68.

PETERSON, G. *et al.* Development of microarray and multiplex polymerase chain reaction assays for identification of serovars and virulence genes in *Salmonella enterica* of human or animal origin. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 22, n. 4, p. 559-569, July 2010.

PEZELLA, C. *et al.* Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 903-908, Mar. 2004.

PIRAS *et al.* Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 10, p. 1875-1878, Oct. 2015.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W. Supplement 1998 (no. 42) to the Kauffmann-White scheme. **Research Microbiology**, v. 151, p. 63-65, July 2000.

POPOFF, M.Y., LE MINOR, L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars, 7th revision. **World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella**, Pasteur Institute, France. 1997.

PRAGER, R. *et al.* Molecular properties of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B distinguish between its systemic and its enteric pathovars. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4270-7278, Sep. 2003.

PRAGER, R. *et al.* Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 7, p. 605-17, Dec. 2000.

PROROGA, Y.T.R. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains from food of animal origin in southern Italy. **Folia Microbiologica**, *online*, June 2015.

PUFFAL, J. **Investigação de genes de resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme em isolados de *Salmonella* Enteritidis**. 2013. 52f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

PUI, C.F. *et al. Salmonella*: A foodborne pathogen. **International Food Research Journal** v.18, p. 465-473, 2011.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. *et al*. Serotype and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolates from commercial birds and poultry environment in Mississippi. **Avian Disease**, v. 58, n. 1, p. 64-70, Mar. 2014.

RABSCH, W. Detection of *Salmonella* Typhimurium phage typing for pathogens. *In:* SCHATTEN, H.; EISENSTARK, A. (Ed.). ***Salmonella* – Methods and Protocols**. 1. ed. Totowa: Humana Press, 2007. cap. 10, p. 177-211.

RIBEIRO, A.R. *et al. Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, Apr. 2007

RIBOT, E.M. *et al.* Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens And Disease**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

ROBINSOM, S. The Big Five: Most Common *Salmonella* Strains in Foodborne Illness Outbreaks. **Food Safety**. Disponível em: <http://www.foodsafetynews.com/2013/08/the-five-most-common-salmonella-strains/#.UsbJ5dJDunI>. Acesso em: 03 jan. 2014.

RODLOFF, A. *et al.* Susceptible, Intermediate, and Resistant – The Intensity of Antibiotic Action. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 105, n. 39, p. 657-662, Sep. 2008.

RODRIGUES, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* spp. em aves e material avícola no Brasil. *In*: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2005, Santos. **Anais.** Santos: FACTA, v. 2, p. 223-228. 2005.

RODRIGUES, D.P. Programa de monitoramento de resistência antimicrobiana de enteroinfecções bacterianas do Ministério da Saúde. **Palestra**. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas. 2008.

RODRIGUES, L.B. **Avaliação da formação de biofilmes e das condições higiênico-sanitárias em superfícies de contato com alimentos em sala de corte de matadouro de aves**. 2009. 115f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

RODRIGUES, L.B. *et al.* Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilmes em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 225-230, 2009.

RODRIGUES, L.B. *et al.* Formação de biofilme a 36ºC, 25ºC, 9ºC e 3ºC por *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças alimentares. *In*: Congresso Latino-Americano e Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos, 5., 2011, Salvador. **Anais**. Salvador: Colégio Brasileiro de Médicos Veterinários Higienistas de Alimentos, 2011.

RÖMLING, U. Cellulose Biosynthesis in *Enterobacteriaceae*. *In*: BROWN JR., R.M.; SAXENA, I.M. (Ed.). **Cellulose: Molecular and Structural Biology**. 1. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. cap. 7, p. 107-122.

RÖMLING, U. Characterization of the rdar morphotype, a multicellular behaviour in Enterobacteriaceae. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 11, p. 1234-1246, June 2005.

RÖMLING, U. *et al.* AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 10-23, Apr. 2000.

ROSENGREN, L.; GOW, S.; WEESE, S. Antimicrobial Use and Resistance in Pigs and Chickens: A review of the science, policy, and control practices from farm to slaughter. **National Collaborating Centre for Infectious Disease**, 118p. 2009.

ROTGER, R.; CASADESÚS, J. The virulence plasmids of *Salmonella*. **International Microbiology**. v. 2, n. 3, p. 177-184, Sep. 1999.

RYCHLIK, I. *et al.* Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 9, p. 1-9, Dec. 2009.

SALISBURY, A.M.; BRONOWKSI, C.; WIGLEY, P. *Salmonella* Virchow isolates from human and avian origins in England – molecular characterization and infection of epithelial cells and poultry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p.1505-1514, Dec. 2011.

SANTOS, L.R. *et al.* Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 1, p. 1-4, Jan./Feb. 2003.

SCHONEWILLE, W. *et al.* Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. **FEMS Immunology: Medical Microbiology**, v. 65, p.360-365, May 2012.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 17, n. 6, p. 431–437, June 2001.

SCHWARZ, S. *et al.* Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 601-604, Feb. 2010.

SHEFFIELD, C.L.; CRIPPEN, T.L. Invasion and Survival of *Salmonella* in the Environment: The Role of Biofilms. *In*: KUMAR, Y. (Ed.) ***Salmonella* - A Diversified Superbug.** 1. ed. Croatia: Intech, 2012. v. 1, cap. 1, p. 3-28.

SHIVAPRASAD, H.L.; BARROW, P.A. *Salmonella* infections – Pullorum Disease and Fowl Typhoid. *In*: SAIF, Y.M. (Ed.). **Disease of Poultry.** 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008. cap., 16, p. 620-636.

SILVA, C.F. *et al. Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, n. 1229, p. 1-8, 2014.

SILVA, D.L.; CELIDONIO, F.A.; OLIVEIRA, K.M.P. Verificação da temperatura de refrigeradores domésticos para minimizar a deterioração e possíveis doenças veiculadas por alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 22, n. 164, p. 42-45, set. 2008.

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

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91-99, Apr. 2012.

SKYBERG, J.A.; LOGUE, C.M.; NOLAN, L.K. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. **Avian Diseases**, v. 50, n. 1, p. 77–81, Mar. 2006.

SOLOMON, E.B. *et al.* Biofilm Formation, Cellulose Production, and Curli biosynthesis by *Salmonella* Originating from Produce, Animal, and Clinical Sources. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 5, p. 906-912, May 2005.

STEENACKERS, H. *et al. Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v. 45, p. 502–531, Mar. 2012.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 5, p. 428–432, 2004.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, v. 20, n. 3, p. 339-343, June 2003.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, Apr. 2000.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v. 115, n. 8, p. 891–9, Aug. 2007.

STEWART, P.S.; COSTERTON, J.W. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, p. 135-138, July 2001.

SWAMY, S.C. *et al.* Virulence determinants *invA* and *spvC* in Salmonellae isolated from poultry products, wastewater and human sources. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 3768-3771, Oct. 1996.

THOMAS, C.M.; NIELSEN, K.M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711-721, Sep. 2005.

TONDO, E.C. *et al.* Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1027-1037, Oct. 2010.

TONDO, E.C.; RITTER, A.C. *Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade. *In*: MONTES, A.S.; SANTOS, P.E. (Ed.). ***Salmonella*: classification, genetics and disease outbreaks.** 1.ed. New York: Nova Science Publishers, 2012, v. 1, cap. 7, p. 175-191.

TURKI, Y. *et al.* Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 940-946, Mar. 2012.

VAN ASTEN, A.J.A.M.; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 251-259, June 2005.

VAN HOEK, A. H. *et al.* Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 203, p. 1-27, Sep. 2011.

VAZ, C.S.L *et al.* Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**, v. 89, n. 7, p. 1530-1536, Jul. 2010.

VESTBY, L.K. *et al.* Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v. 5, n. 20, p. 1-6, May 2009.

VIEIRA, M.A.M. Ilhas de Patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

VIEIRA, A.R. *et al.* A resource to link human and non-human sources of *Salmonella*. *In*: ISVEE CONFERENCE, 2009, Durban. **Anais**. WHO Global Foodborne Infections Network Country Databank, 2009.

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

WANG, H. *et al.* Effect of growth media on gene expression levels in *Salmonella* Typhimurium biofilm formed on stainless steel surface. **Food Control**, v. 59, p. 546-552, 2016.

WANG, H. *et al.* Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 378-384, Oct. 2013.

WASSENAAR, T.M.; GAASTRA, W. Bacterial virulence: can we draw the line? **FEMS Microbiology Letters**, v. 201, n. 1, p. 1-7, July 2001.

WEITZMAN, J.B. Sequencing *Salmonella*. **Genome Biology**, v. 2, n. 10, *online version*, Oct. 2001.

WHITE, A.P. *et al.* Thin Aggregative Fimbriae and Cellulose Enhance Long-Term Survival and Persistence of *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3219-3227, May 2006.

WHO (World Health Organization). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. **WHO**. 2011a. 38p.

WHO (World Health Organization). Data Analysis 2. **WHO.** Disponível em: < http://www.who.int/drugresistance/WHOsoftware/en/>. Acesso em: 20 maio 2015

WHO (World Health Organization). *Salmonella*. **WHO. 2014.** Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>. Acesso em: 03 jan. 2014.

WHO (World Health Organization). Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. **WHO.** 2011b. 88p.

WISNER, A. *et al.* The *Salmonella* Pathogenicity Island-1 and -2 Encoded Type III Secretion Systems. *In*: KUMAR, Y. (Ed.). ***Salmonella* - A Diversified Superbug.** 1. ed. Croatia: Intech, 2012. v. 1, cap. 24, p. 469-494.

WOLCOTT, R. *et al.* The polymicrobial nature of biofilm infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 2, p. 107-112, Feb. 2013.

XU, H. *et al.* Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. 580-585, Nov./Dec. 2010.

YANG, S.J. *et al*. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**, v. 86, n. 4, p. 295-301, May 2002.

YAU, S.X. *et al.* RSF1010-like plasmids in Australian *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and origin of their sul2-strA-strB antibiotic resistance gene cluster. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 4, p. 249-252, Dec. 2010.

ZÁRATE-BONILLA, L.J. *et al.* Computational modeling and preliminary *iroN*, *fepA*, and *cirA* gene expression in *Salmonella* Enteritidis under iron-deficiency-induced conditions. **Poultry Science**, v. 93, n. 1, p. 221-230, Jan. 2014.

ZHOU, D.; HARDT, W.D.; GALAN, J.E. *Salmonella* Typhimurium encodes a putative iron transport system within the centisome 63 Pathogenicity Island. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 4, p. 1974-1981, Apr. 199.

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 125-148, Oct. 1994.

ZOU, M.; KEELARA, S.; THAKUR, S. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 12, p. 232-238, Mar. 2012.

ZOU, W. *et al.* Microarray analysis of virulence gene profiles in *Salmonella* serovars from food/food animal environment. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 2, p. 94-105, Mar. 2011.

APÊNDICE A – Listas das cepas utilizadas no estudo, conforme o grupo de origem.

Tabela 1 - Cepas isoladas do campo: identificação, fonte de isolamento, sorovar e ano de isolamento.

(continua)

Identificação	Fonte	Sorovar	Ano
1	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2000
2	suabe de arrasto	*S.* Agona	2010
3	suabe de arrasto	*S.* Agona	2011
4	suabe de arrasto	*S.* Typhimurium	2012
5	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2003
6	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2003
7	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2005
8	órgão de ave	*S.* Heidelberg	2000
9	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2005
10	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2006
11	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2006
12	suabe de arrasto	*S.* Heidelberg	2006
13	suabe de arrasto	*S.* Heidelberg	2006
14	suabe de arrasto	*S.* Heidelberg	2006
15	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2006
16	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2006
17	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2006
18	suabe de cloaca	*S.* Heidelberg	2006
19	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
20	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
21	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
22	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
23	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
24	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
25	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
26	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
27	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
28	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
29	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
30	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
31	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
32	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
33	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
34	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
35	órgão de ave	*S.* Enteritidis	1999
36	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
37	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
38	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
39	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000

Tabela 1 - Cepas isoladas do campo: identificação, fonte de isolamento, sorovar e ano de isolamento.

(continuação)

Identificação	Fonte	Sorovar	Ano
40	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
41	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
42	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
43	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
44	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
45	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
46	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
47	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
48	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
49	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
50	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
51	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
52	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
53	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2000
54	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
55	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2000
56	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2001
57	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2001
58	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2001
59	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2001
60	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2001
61	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2001
62	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2001
63	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2001
64	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2001
65	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2001
66	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2001
67	órgão de ave	*S.* Enteritidis	2001
68	suabe de arrasto	*S.* Enteritidis	2001
69	suabe de cloaca	*S.* Anatum	2012
70	suabe de cloaca	*S.* Anatum	2012
71	suabe de cloaca	*S.* Anatum	2012
72	suabe de cloaca	*S.* Bredeney	2012
73	suabe de cloaca	*S.* Schwarzengrund	2012
74	suabe de cloaca	*S.* Bredeney	2012
75	suabe de cloaca	*S.* Bredeney	2012
76	suabe de cloaca	*S.* Bredeney	2012
77	gaiola (frigorífico)	*S.* Agona	2012
78	gaiola (frigorífico)	*S.* Infantis	2012
79	gaiola (frigorífico)	*S.* Infantis	2012
80	suabe de arrasto	*S.* Typhimurium	NI
81	suabe de arrasto	*S.* Typhimurium	NI

Tabela 1 - Cepas isoladas do campo: identificação, fonte de isolamento, sorovar e ano de isolamento.

(conclusão)

Identificação	Fonte	Sorovar	Ano
82	suabe de arrasto	*S.* Typhimurium	NI
83	suabe de cloaca	*S.* Typhimurium	NI
84	suabe de cloaca	*S.* Typhimurium	NI

NI = não informado

Tabela 2 - Cepas isoladas de produtos: identificação, fonte de isolamento, sorovar e ano de isolamento.

(continua)

Identificação	Fonte	Sorovar	Ano
85	carcaça	*S.* Enteritidis	2006
86	carcaça	*S.* Enteritidis	2006
87	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
88	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
89	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
90	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
91	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
92	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
93	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
94	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
95	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
96	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
97	carcaça	*S.* Heidelberg	2003
98	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
99	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
100	carcaça	*S.* Enteritidis	2003
101	carcaça	*S.* Heidelberg	2004
102	carcaça	*S.* Heidelberg	2004
103	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
104	carcaça	*S.* Heidelberg	1996
105	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
106	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
107	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
108	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
109	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
110	carcaça	*S.* Heidelberg	1995
111	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
112	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
113	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
114	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
115	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
116	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
117	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
118	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
119	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
120	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
121	carcaça	*S.* Heidelberg	2006
122	carcaça	*S.* Hadar	1995
123	carcaça	*S.* Agona	1995
124	carcaça	*S.* Hadar	1995
125	carcaça	*S.* Hadar	1996
126	carcaça	*S.* Hadar	1995

Tabela 2 - Cepas isoladas de produtos: identificação, fonte de isolamento, sorovar e ano de isolamento.

(conclusão)

Identificação	Fonte	Sorovar	Ano
127	carcaça	*S.* Hadar	1996
128	carcaça	*S.* Hadar	1996
129	carcaça	*S.* Hadar	1996
130	carcaça	*S.* Hadar	1996
131	carcaça	*S.* Hadar	1996
132	carcaça	*S.* Hadar	1996
133	carcaça	*S.* Hadar	1996
134	carcaça	*S.* Hadar	1996
135	carcaça	*S.* Hadar	1996
136	carcaça	*S.* Hadar	1996
137	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
138	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
139	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
140	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
141	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
142	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
143	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
144	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
145	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
146	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
147	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
148	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
149	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
150	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
151	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
152	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
153	carcaça	*S.* Enteritidis	1996
154	carcaça	*S.* Brandenburg	2012
155	carcaça	*S.* Brandenburg	2012
156	carcaça	*S.* Tennessee	2012
157	carcaça	*S.* Tennessee	2012
158	carcaça	*S.* Bredeney	2012
159	carcaça	*S.* Anatum	2012
160	carcaça	*S.* Tennessee	2012
161	carcaça	*S.* Anatum	2012
162	CMS	*S.* Typhimurium	NI
163	CMS	*S.* Typhimurium	NI

NI – não informado

Tabela 3 - Cepas isoladas de surtos: identificação, fonte de isolamento, sorovar e ano de isolamento.

(continua)

Identificação	Fonte	Sorovar	Ano
164	maionese	*S.* Enteritidis	2003
165	maionese	*S.* Enteritidis	2004
166	sobremesa (torta)	*S.* Enteritidis	2004
167	maionese	*S.* Enteritidis	2005
168	sobremesa (torta)	*S.* Enteritidis	2006
169	sobremesa (torta)	*S.* Enteritidis	2006
170	maionese	*S.* Enteritidis	2006
171	tomate	*S.* Enteritidis	2007
172	maionese	*S.* Enteritidis	2007
173	carne (bovina)	*S.* Enteritidis	2007
174	salada de batata	*S.* Enteritidis	2007
175	carne (frango)	*S.* Enteritidis	2007
176	carne (bovina + suína)	*S.* Enteritidis	2007
177	ovos *in natura*	*S.* Enteritidis	2007
178	carne (frango)	*S.* Enteritidis	2007
179	maionese	*S.* Enteritidis	2007
180	carne (bovina)	*S.* Enteritidis	2007
181	embutido	*S.* Enteritidis	2008
182	molho (carne bovina)	*S.* Enteritidis	2008
183	embutido	*S.* Enteritidis	2008
184	ovos	*S.* Enteritidis	2008
185	sobremesa (pudim)	*S.* Enteritidis	2008
186	laticínio	*S.* Enteritidis	2008
187	salada de batata	*S.* Enteritidis	2008
188	maionese	*S.* Enteritidis	2009
189	sobremesa (torta)	*S.* Enteritidis	2009
190	maionese	*S.* Enteritidis	2010
191	batata cozida	*S.* Enteritidis	2010
192	maionese	*S.* Enteritidis	2010
193	carne (bovina)	*S.* Enteritidis	2010
194	maionese	*S.* Enteritidis	2010
195	sobremesa (sagu)	*S.* Enteritidis	2010
196	carne (frango)	*S.* Enteritidis	2010
197	embutido	*S.* Enteritidis	2010
198	carne (bovina)	*S.* Enteritidis	2010
199	laticínio	*S.* Enteritidis	2011
200	maionese	*S.* Enteritidis	2011
201	maionese	*S.* Enteritidis	2012
202	milho cozido	*S.* Enteritidis	2012
203	carne (bovina)	*S.* Enteritidis	2012
204	maionese	*S.* Enteritidis	2012
205	legumes	*S.* Enteritidis	2012
206	ovos *in natura*	*S.* Enteritidis	2012
207	ovos *in natura*	*S.* Enteritidis	2012

Tabela 3 - Cepas isoladas de surtos: identificação, fonte de isolamento, sorovar e ano de isolamento.

(conclusão)

Identificação	Fonte	Sorovar	Ano
208	ovo	*S.* Enteritidis	2012
209	hamburguer	*S.* Enteritidis	2012
210	hamburguer	*S.* Enteritidis	2012
211	hamburguer	*S.* Enteritidis	2012
212	hamburguer	*S.* Enteritidis	2012
213	hamburguer	*S.* Enteritidis	2012
214	molho (queijos)	*S.* Enteritidis	2012
215	hamburguer	*S.* Enteritidis	2012
216	sobremesa (torta)	*S.* Enteritidis	2008
217	carne (suína)	*S.* Enteritidis	2008
218	sobremesa (torta)	*S.* Enteritidis	2008
219	maionese	*S.* Enteritidis	2008
220	sobremesa (torta)	*S.* Enteritidis	2008
221	carne (bovina)/embutido	*S.* Enteritidis	2008
222	arroz	*S.* Enteritidis	2008
223	feijão	*S.* Enteritidis	2008
224	salada de frutas	*S.* Enteritidis	2008
225	carne (suína)	*S.* Enteritidis	2008
226	embutido	*S.* Enteritidis	2008
227	maionese	*S.* Enteritidis	2008
228	carne (bovina)	*S.* Enteritidis	2008
229	feijão	*S.* Enteritidis	2008
230	carne (bovina)	*S.* Enteritidis	2008
231	laticínio	*S.* Enteritidis	2007
232	embutido	*S.* Enteritidis	2007
233	maionese	*S.* Enteritidis	2007
234	carne (frango)	*S.* Enteritidis	2007
235	carne (bovina)	*S.* Enteritidis	2007
236	sobremesa (torta)	*S.* Enteritidis	2007
237	embutido	*S.* Enteritidis	2007
238	batata palha	*S.* Enteritidis	2007
239	miúdo (frango)	*S.* Enteritidis	2007
240	salpicão	*S.* Enteritidis	2013
241	salpicão	*S.* Enteritidis	2013
242	maionese	*S.* Enteritidis	2013
243	maionese	*S.* Enteritidis	2013

APÊNDICE B – Pesquisa de genes associados à virulência

Tabela 1 – Pesquisa de genes associados à virulência através da técnica de PCR: nome e função.

(continua)

Nome	Gene	Função relacionada à virulência
Fímbria Longa Polar	*lpfA*	- favorece o tropismo pelas Placas de Peyer - adesão às células M do intestino - confere imunidade cruzada entre sorovares
Fímbria Longa Polar	*lpfC*	- reconhecimento do hospedeiro e invasão
Fímbria Agregativa	*agfA*	- autoagregação (maior sobrevivência) - interação entre a *Salmonella* e o intestino - formação de biofilmes
Fímbria de *S.* Enteritidis	*sefA*	- melhor interação entre bactéria e macrófagos - atuação em conjunto com outras fímbrias
Fímbria codificada por plasmídeo	*pefA*	- reconhecimento do hospedeiro e invasão
Plasmídeo de Virulência de *Salmonella*	*spvC*	- afeta interação do sistema imune do hospedeiro - aumenta taxa de crescimento da bactéria
Plasmídeo de Virulência de *Salmonella*	*spvB*	- crescimento no interior da célula hospedeira
Invasiva	*invA*	- componente da estrutura dos TTSS - reconhecimento do hospedeiro e invasão - internalização da bactéria para invasão de células epiteliais
Hiperinvasiva	*hilA*	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - regulação dos componentes do TTSS
Avirulência	*avrA*	- indução de apoptose celular - inibe produção de IL-8 e TNF-α - proteína efetora dos TTSS
Proteína da membrana externa de *Salmonella*	*sopB*	- proteína efetora dos TTSS - reconhecimento do hospedeiro e invasão - associada à ativação das vias de inflamação
Proteína da membrana externa de *Salmonella*	*sopE*	- proteína efetora dos TTSS - deformação da membrana plasmática e citoesqueleto da célula do hospedeiro
Proteína de invasão regulada por oxigênio	*orgA*	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - componente da estrutura dos TTSS
Proteína intermembrana	*prgH*	- componente da estrutura dos TTSS - reconhecimento do hospedeiro e invasão
Proteína de apresentação de antígeno	*spaN*	- entrada em células não fagocíticas - morte de macrófagos - componente da estrutura dos TTSS
Proteína da membrana externa	*tolC*	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - funcionamento de alguns sistemas de efluxo
Proteína de membrana	*pagC*	- sobrevivência no interior do macrófago

Tabela 1 – Pesquisa de genes associados à virulência através da técnica de PCR: nome e função.

(conclusão)

Nome	Gene	Função relacionada à virulência
Proteína da membrana externa	*sifA*	- proteína efetora dos TTSS - invasão e sobrevivência nos tecidos do hospedeiro
Homólogo invasiva de *Salmonella*	*sivH*	- colonização das Placas de Peyer - proteína efetora dos TTSS
Proteína sobrevivência no macrófago	*msgA*	- sobrevivência no interior do macrófago
Proteína secreção da membrana externa	*spiA*	- sobrevivência no interior do macrófago - participação na formação de biofilmes
Transportador de ferro de *Salmonella*	*sitC*	- aquisição de ferro
Receptor sideróforo relacionado ferro	*iroN*	- aquisição de ferro
toxina citoletal distensiva	*cdtB*	- reconhecimento do hospedeiro e invasão - toxina
Proteína de invasão celular	*sipB*	- entrada em células não fagocíticas - morte de macrófagos - componente da estrutura dos TTSS
Proteína efetora	*sseL*	- habilidade de replicação - sobrevivência intracelular - invasão de macrófagos
Enterotoxina de *Salmonella*	*stn*	- manutenção da composição e integridade da membrana - enterotoxina associada à ocorrência de diarreia em humanos

(COLLINSON *et al.*, 1992; BÄUMLER; HEFFRON, 1995; SWAMY *et al.*, 1996; GUO *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2002; KINGSLEY *et al.*, 2003; PRAGER *et al.*, 2003; SKYBERG; LOGUE; NOLAN, 2006; RYTKÖNEN *et al.*, 2007; PETERSON *et al.*, 2010; NAKANO *et al.*, 2012 ; BARMAN *et al.*, 2013; BORGES *et al.*, 2013)

Tabela 2 – Pesquisa de genes associados à virulência através da técnica de PCR: sequência dos *primers*, tamanho do amplicon e controles positivos utilizados para cada protocolos.

(continua)

Gene	*Primer*	pb	Controle positivo
lpfA	F - CTTTCGCTGCTGAATCTGGT R - CAGTGTTAACAGAAACCAGT	250	*S.* Enteritidis ATCC 13076
agfA	F - GGCGGAAGCTTGAATTCGTACTGTACTCCAGTCAAGTGGGG R - GGGAAAGGTTGAATTCAGGACGCTACTTGTG	350	*S.* Enteritidis ATCC 13076
sefA	F - GATACTGCTGAACGTAGAAGG R - GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	488	*S.* Enteritidis ATCC 13076
invA	F - GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA R - TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284	*S.* Enteritidis ATCC 13076
hilA	F - CTGCCGCAGTGTTAAGGATA R - CTGTCGCCTTAATCGCATGT	497	*S.* Enteritidis ATCC 13076
avrA	F - GTTATGGACGGAACGACATCGG R - ATTCTGCTTCCCGCCGCC	385	*S.* Enteritidis ATCC 13076
sopE	F - ACACACTTTCACCGAGGAAGCG R - GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	398	*S.* Enteritidis ATCC 13076
sivH	F - CAGAATGCGAATCCTTCGCAC R - GTATGCGAACAAGCGTAACAC	763	*S.* Enteritidis ATCC 13076
spvC	F - CGGAAATACCATCTACAAATA R - CCCAAACCCATACTTACTCTG	669	*S.* Enteritidis ATCC 13076
orgA	F - CAGCGCTGGGGATTACCGTTTTG R - TTTTTGGCAATGCATCAGGGAACA	255	*S.* Enteritidis ATCC 13076
prgH	F - GCCCGAGCAGCCTGAGAAGTTAGAAA R - TGAAATGAGCGCCCCTTGAGCCAGTC	756	*S.* Enteritidis ATCC 13076
spaN	F - AAAAGCCGTGGAATCCGTTAGTGAAGT R - CAGCGCTGGGGATTACCGTTTTG	504	*S.* Enteritidis ATCC 13076
tolC	F - TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC R - CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	161	*S.* Enteritidis ATCC 13076
sipB	F - GGACGCCGCCCGGGAAAAACTCTC R - ACACTCCCGTCGCCGCCTTCACAA	875	*S.* Enteritidis ATCC 13076
sitC	F - CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC R - CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768	*S.* Enteritidis ATCC 13076
pagC	F - CGCCTTTTCCGTGGGGTATGC R - GAAGCCGTTTATTTTTGTAGAGGAGATGTT	454	*S.* Enteritidis ATCC 13076
msgA	F - GCCAGGCGCACGCGAAATCATCC R - GCGACCAGCCACATATCAGCCTCTTCAAAC	189	*S.* Enteritidis ATCC 13076
spiA	F - CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG R - CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550	*S.* Enteritidis ATCC 13076
sopB	F - CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG R - TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	220	*S.* Enteritidis ATCC 13076
iroN	F - CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC R - ACTGGCACGGCTCGCTGTCGCTCTAT	1205	*S.* Enteritidis ATCC 13076
lpfC	F - GCCCCGCCTGAAGCCTGTGTTGC R - AGGTCGCCGCTGTTTGAGGTTGGATA	641	*S.* Enteritidis ATCC 13076

Tabela 2 – Pesquisa de genes associados à virulência através da técnica de PCR: sequência dos *primers*, tamanho do amplicon e controles positivos utilizados para cada protocolos.

(conclusão)

Gene	*Primer*	pb	Controle positivo
sifA	F - TTTGCCGAACGCGCCCCCACACG R - GTTGCCTTTTCTTGCGCTTTCCACCCATCT	449	*S.* Enteritidis ATCC 13076
cdtB	F - ACAACTGTCGCATCTCGCCCCGTCATT R - CAATTTGCGTGGGTTCTGTAGGTGCGAGT	268	*S.* Senftenberg (CDPA/ UFRGS)
pefA	F - GCGCCGCTCAGCCGAACCAG R - GCAGCAGAAGCCCAGGAAACAGTG	157	*S.* Enteritidis ATCC 13076
spvB	F - CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA R - GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	717	*S.* Enteritidis ATCC 13076
sseL	F - TTCCGCGACAACCGACCTTTCTAA R - TTCTTGAACCAGACCTTGCGTTGC	169	*S.* Enteritidis ATCC 13076
stn	F - TTGTGTCGCTATCACTGG CAACC R - ATTCGTAACCCGCTCTCGTCC	619	*S.* Enteritidis ATCC 13076

Tabela 3 – Pesquisa de genes associados à virulência através da técnica de PCR: concentrações dos reagentes do mix, condições e números de ciclos do termociclador.

(continua)

Gene	Concentração dos reagentes	Condições do termociclador	Ciclos
lpfA *sefA*	2,5µL Tampão 10x, 2,5µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 2U Taq Polimerase, 2µL $MgCl_2$ (4mM), 5µL DNA	94°C - 1seg. 56°C - 1seg. 74°C - 21seg.	35
agfA	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 1U Taq Polimerase, 1,25µL $MgCl_2$ (2,5mM), 2µL DNA	94°C - 1seg. 55°C - 1seg. 74°C - 21seg.	35
invA	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 1U Taq Polimerase, 1,25µL $MgCl_2$ (2,5mM), 2µL DNA	94°C - 1seg. 55°C - 1seg. 74°C - 1seg.	35
avrA *hilA*	2,5µL Tampão 10X, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20 pmol), 1U Taq Polimerase, 1µL $MgCl_2$ (2mM), 3µL de DNA	94°C - 1 min 30seg. 63°C - 1min. 72°C - 1min.	30
sopE	2,5µL Tampão 10x, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 1U Taq Polimerase, 1µL $MgCl_2$ (2mM), 2µL DNA	94° C - 1min. 55° C - 1min. 72° C - 1min.	30
sivH	2,5µL Tampão 10X, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 1U Taq Polimerase, 1µL $MgCl_2$ (2mM), 2µL DNA	94°C - 30seg. 56°C - 45seg. 72°C - 45seg.	30
spvC	2,5µL Tampão 10X, 3µL dNTPs (2,5mM), 3,5µL cada primer (20 pmol), 1U Taq Polimerase, 1µL $MgCl_2$ (2mM), 2µL de DNA	93°C - 1min. 42°C - 1min. 72°C - 2min.	30
sseL	2,5µL Tampão 10X, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 1,25µL $MgCl_2$ (2,5mM), 1U Taq Polimerase, 2µL de DNA	94°C - 30seg. 62°C - 15seg. 58°C - 15seg. 72°C - 1min.	35
iroN	2,5µL Tampão 10X, 0,5µL dNTPs (10mM), 0,05µL cada primer (100pmol), 3µL $MgCl_2$ (6mM), 0,75U Taq Polimerase, 2,5µL de DNA	94°C - 30seg. 66,5°C - 30seg. 72°C - 2min.	25
msgA *cdtB* *pagC* *spiA* *spvB*	2,5µL Tampão 10X, 0,5µL dNTPs (10mM), 0,05µL cada primer (100pmol), 3µL $MgCl_2$ (6mM), 0,75U Taq Polimerase, 2,5µL de DNA	94°C - 30seg. 66,5°C - 30seg. 72°C - 2min.	25

Tabela 3 – Pesquisa de genes associados à virulência através da técnica de PCR: concentrações dos reagentes do mix, condições e números de ciclos do termociclador.

(conclusão)

Gene	Concentrações dos reagentes do *mix*	Condições do termociclador	Número de ciclos
sitC *lpfC* *sifA* *sopB* *pefA*	2,5µL Tampão 10X, 0,5µL dNTPs (10mM), 0,05µL cada primer (100pmol), 3µL $MgCl_2$ (6mM), 0,75U Taq Polimerase, 2,5µL de DNA	94°C - 30seg. 66,5°C - 30seg. 72°C - 2min.	25
sipB *prgH* *spaN* *orgA* *tolC*	2,5µL Tampão 10X, 0,5µL dNTPs (10mM), 0,05µL cada primer (100pmol), 3µL $MgCl_2$ (6mM), 0,75U Taq Polimerase, 2,5µL de DNA	94°C - 30seg. 66,5°C - 30seg. 72°C - 2 min.	25
stn	2,5µL Tampão 10X, 2µL dNTPs (2,5mM), 1µL cada primer (20pmol), 1,25µL $MgCl_2$ (2,5mM), 1U Taq Polimerase, 2,5µL de DNA	94°C - 1min. 59°C - 1min. 72°C - 1min.	25

Legenda: segundos (seg.), minutos (min.).

PUBLICAÇÕES E ARTIGOS RELACIONADOS

Artigo 1 publicado: "Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil."

(**Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 12, p.1416-1422, Dez. 2013)

Pesq. Vet. Bras. 33(12):1416-1422, dezembro 2013

Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil[1]

Karen A. Borges[2]*, Thales Q. Furian[2], Anderlise Borsoi[3], Hamilton L.S. Moraes[2], Carlos T.P. Salle[2] e Vladimir P. Nascimento[2]

ABSTRACT.- Borges K.A., Furian T.Q., Borsoi A., Moraes H.L.S., Salle C.T.P. & Nascimento V.P. 2013. **Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in Southern Brazil.** *Pesquisa Veterinária Brasileira 33(12):1416-1422.* Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. E-mail: karen.borges@ufrgs.br

Salmonella spp. are considered the main agents of foodborne disease and *Salmonella* Enteritidis is one of the most frequently isolated serovars worldwide. The virulence of *Salmonella* spp. and their interaction with the host are complex processes involving virulence factors to overcome host defenses. The purpose of this study was to detect virulence genes in *S.* Enteritidis isolates from poultry in the South of Brazil. PCR-based assays were developed in order to detect nine genes (*lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH* and *spvC*) associated with the virulence in eighty-four isolates of *S.* Enteritidis isolated from poultry. The *invA, hilA, sivH, sefA* and *avrA* genes were present in 100% of the isolates; *lpfA* and *sopE* were present in 99%; *agfA* was present in 96%; and the *spvC* gene was present in 92%. It was possible to characterize the isolates with four different genetic profiles (P1, P2, P3 and P4), as it follows: P1, positive for all genes; P2, negative only for *spvC*; P3, negative for *agfA*; and P4, negative for *lpfA, spvC* and *sopE*. The most prevalent profile was P1, which was present in 88% of the isolates. Although all isolates belong to the same serovar, it was possible to observe variations in the presence of these virulence-associated genes between different isolates. The characterization of the mechanisms of virulence circulating in the population of *Salmonella* Enteritidis is important for a better understanding of its biology and pathogenicity. The frequency of these genes and the establishment of genetic profiles can be used to determine patterns of virulence. These patterns, associated with *in vivo* studies, may help develop tools to predict the ability of virulence of different strains.

INDEX TERMS: *Salmonella* Enteritidis, PCR, virulence profile, poultry.

RESUMO.- [**Detecção de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de frangos na região sul do Brasil.**] *Salmonella* spp. estão entre os principais agentes causadores de doenças transmitidas por alimentos, e o sorovar *Salmonella* Enteritidis é o mais frequentemente isolado no mundo. A virulência de *Salmonella* spp. e a sua interação com o hospedeiro são processos complexos que envolvem fatores de virulência para sobreviver às defesas do hospedeiro. O objetivo deste estudo foi detectar genes de virulência em cepas de *S.* Enteritidis isoladas a partir de fontes avícolas no sul do Brasil. Ensaios de PCR foram desenvolvidos para a detecção de nove genes (*lpfA, agfA, sefA, invA, hilA, avrA, sopE, sivH* e *spvC*) associados à virulência em oitenta e quatro amostras de *S.* Enteritidis. Os genes *invA, hilA, sivH, sefA* e *avrA* estavam presentes em 100% dos isolados; *lpfA* e *sopE* estavam presentes em 99%; *agfA* em 96%; e o gene *spvC* estava presente em 92%. Foi possível caracterizar os isolados em quatro perfis genéticos distintos (P1, P2, P3 e P4), sendo P1 positivo para todos os genes; P2 negativo apenas para *spvC*; P3 negativo para *agfA* e P4 negativo para *lpfA, spvC* e *sopE*. O perfil de maior frequência foi P1, presente em 88% dos isolados. Apesar de

[1] Received on June 27, 2013.
Accepted for publication on October 26, 2013.

[2] Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves 8824, Porto Alegre, RS 91540-000, Brazil. *Corresponding author: karen.borges@ufrgs.br

[3] Tuiuti Universidade do Paraná, Rua Sydnei Antônio Rangel 238, Curitiba, PR 82010-330, Brazil.

"Biofilm production, antimicrobial resistance and virulence-associated genes among *Salmonella enterica* serovars"

(Artigo 2: a ser submetido)

ABSTRACT: Salmonella spp. is one of the most common agents of foodborne disease in several countries, including Brazil, one of the world's most important poultry producers. Salmonellosis outbreaks are often associated with poultry and poultry products. The aim of this study was the phenotypic and the genotypic characterization of Salmonella from four different serovars: S. Enteritidis, S. Hadar, S. Heidelberg and S. Typhimurium. A total of 221 Salmonella enterica strains of serovars Enteritidis (n=150), Heidelberg (n=49), Hadar (n=14) and Typhimurium (n=8) were selected from our laboratory stock collection. The bacteria were isolated from avian sources and from salmonellosis outbreaks in the south region of Brazil. Biofilm production in plastic microtitre-plates was evaluated by crystal violet staining method at 37ºC for 24 hours. Strains were classified as no biofilm producers, weak biofilm producers, moderate biofilm producers or strong biofilm producers. Antimicrobial susceptibility testing to ten antimicrobial agents (amoxicillin, ceftiofur, ciprofloxacin, spectinomycin, enfloxacin, gentamicin, tetracycline, sulfafurazole, sulfamethoxazole-trimethoprim and chloramphenicol) was performed by the disk diffusion method, according to CLSI guidelines. Strains were classified as sensitive, intermediate (reduced susceptibility) or resistant. Strains that presented resistance to three or more classes of antimicrobials were considered multidrug resistant. Polymerase chain reaction amplification was conducted for the detection of 27 virulence-associated genes. Statistical analysis showed a significant difference between S. Heidelberg and S. Enteritidis, and between S. Heidelberg and S. Anatum in biofilm production ability. 72% of S. Enteritidis strains produced biofilm (37.8% were classified as moderate or strong producers). All strains of S. Typhimurium were able to produce biofilm, but almost 88% were classified as weak producers. 57.1% of S. Heidelberg strains produced biofilm (51% were classified as weak producers). 85.7% of S. Hadar strains were biofilm producers, but only one were classified as strong producer. The highest antimicrobial resistance rates for S. Enteritidis were to sulfafurazole (74.8%), ciprofloxacin (41.1%) and enrofloxacin (17.2%). For S. Typhimurium, the highest rates were to sulfafurazole (100%), tetracycline (87.5%), ciprofloxacin (62.5%), spectinomycin (62.5%), trimethoprim + sulfafurazole (37.5%) and chloramphenicol (25%). All strains of serovar S. Hadar were resistant to tetracycline and sulfafurazol, and 7.1% were resistant to ciprofloxacin. The strains of S. Heidelberg were resistant to sulfafurazol (95.9%), ciprofloxacin (22.4%) and enrofloxacin (20.4%). According to the parameters adopt to classify multidrug resistant strains, 8.7% of S. Enteritidis, 4.1% of S. Heidelberg, 87.5% of S. Typhimurium and 7.1% of S. Hadar were considered multidrug resistant. It was observed a positive association between the serovar and the presence of eight virulence genes. sefA, spvB, spvC and pefA were associated with S. Enteritidis, lpfA and lpfC with S. Enteritidis, S. Heidelberg and S. Hadar. The gene sopE was associated with S. Enteritidis and S. Heidelberg, and iroN with S. Typhimurium, S. Heidelberg and S. Hadar. The presence of cdtB is negatively associated with the four analyzed serotypes. Our findings provide baseline information on the phenotypic and the genotypic characterization of Salmonella serovars, and provide support to hypothesis that the potential to acquire virulence genes and antimicrobial resistance may varies among serotypes.

"Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry, poultry meat and salmonellosis outbreaks in southern Brazil"

(Artigo 3: a ser submetido)

ABSTRACT: *Salmonella* spp. is one of the most common agents of foodborne diseases in several countries, including Brazil, one of the world's most important poultry producers. Salmonellosis outbreaks are often associated with poultry and poultry products and *S.* Enteritidis is one of the most prevalent serotypes associated with these outbreaks. The aim of this study was the phenotypic and the genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. 150 strains isolated from broilers (n=50), chicken meat (n=20) and food involved in salmonellosis outbreaks (n=80) in southern Brazil were randomly selected from our stock collection. Biofilm formation on polystyrene microplates was quantified with the crystal violet staining method at 37ºC for 24 hours. Strains were classified as no biofilm producers, weak biofilm producers, moderate biofilm producers or strong biofilm producers. Antimicrobial susceptibility testing to ten antimicrobial agents (amoxicillin, ceftiofur, ciprofloxacin, spectinomycin, enfloxacin, gentamicin, tetracycline, sulfafurazole, sulfamethoxazole-trimethoprim and chloramphenicol) was performed by the disk diffusion method, according to CLSI guidelines. Strains were classified as sensitive, intermediate (reduced susceptibility) or resistant. Strains that presented resistance to three or more classes of antimicrobials were considered multidrug resistant. Polymerase chain reaction amplification was conducted for the detection of 27 virulence-associated genes. PCR-ribotyping was carried out for discrimination into different ribotypes, according to the banding patterns. 71.5% of total strains produced biofilm, 20.7% were classified as moderate biofilm producers and 7.3% as strong biofilm producers. Although a larger number of salmonellosis outbreaks strains have produced biofilm, there was no significant difference in the frequency of biofilm production according to the origin of the strains. 94.3% of the strains isolated from broilers or chicken meat and 75% of those isolated from outbreaks were resistant to at least one antimicrobial agent. 9% of all strains were multidrug-resistant. Furthermore, it was observed that resistance to ceftiofur, gentamicin and sulfafurazole was associated with strains of avian origin. There was a significant association between the source of isolation and the presence of eight virulence-associated genes. *spvB, spiA, pagC, sipB, prgH, spaN, sitC* and *lpfC* were associated with avian origin strains, while *iroN* was associated with salmonellosis outbreaks strains. There was no significant association between biofilm production and antimicrobial resistance and neither between biofilm production and the presence of virulence genes. PCR-ribotyping analysis was able to discriminate *S.* Enteritidis strains into two banding patterns (R1 and R2). Profile R2 grouped 98.7% of the strains, which suggests that there is a clonal relationship of *S.* Enteritidis involved with different salmonellosis outbreaks and the same clone is disseminated in the poultry chain. Sequencing of both ribotypes confirmed this clonal relationship. Our results indicate that the source of isolation is not important for biofilm production ability, but it is important for antimicrobial resistance. Some virulence-associated genes are more related to strains isolated from poultry products than those of human origin. Finally, PCR-ribotyping and sequencing findings show that a same clone is related to outbreaks and to poultry products in southern Brazil.