

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

Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica*  
sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.

Marjo Cadó Bessa

PORTO ALEGRE 2006

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

Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.

Marjo Cadó Bessa\*

Tese apresentada como  
requisito parcial para a  
obtenção do grau de Doutor  
em Ciências Veterinárias  
Especialidade na área de  
Bacteriologia

**Orientadora:** Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

**Co-Orientador:** Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal

PORTO ALEGRE 2006

---

\*Farmacêutica Msc.

Marjo Cadó Bessa

**Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.**

Aprovada em 23 de fevereiro de 2006.

APROVADA POR

---

Profa. Dra. Marisa R. I. Cardoso  
Orientadora e Presidente da Comissão

APROVADA POR

---

Profa. Dra. Gertrudes Corção  
Membro da Comissão

APROVADA POR

---

Prof. Dra. Eliana Vaz  
Membro da Comissão

APROVADA POR

---

Prof. Dr. Eduardo Tondo  
Membro da Comissão

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marisa Cardoso, pela orientação, confiança e ensinamentos que levarei pela vida.

Ao Prof. Dr. Cláudio Canal pela Co-Orientação.

À Profa. Dra. Verônica Schmidt pela amizade.

À Profa. Dra. Ana Paula Ravazzolo pela disponibilização do sistema de captura de imagem.

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli pela disponibilização do espectrofotômetro.

Ao Prof. Dr. Eduardo Tondo pelas sugestões técnico-científico.

À Profa. Dra Sílvia Dias de Oliveira pelos ensinamentos e dicas da técnica rep-PCR.

Aos professores da Pós-Graduação da Veterinária e da Microbiologia do ICBS, pelos ensinamentos recebidos.

Ao Dip. Di Scienze Biomediche, University of Sassari, Italy, pela oportunidade, acolhida e empréstimo dos isolados.

Ao Robert Koch Institut, Wernigerode Branch, Germany, pela fagotipificação dos isolados

À Alessandra Sella pela amizade, dedicação e auxílio técnico.

Às meninas do laboratório de Preventiva: Patrícia Schwarz, Luciane Borowsky, Lisandra Murmann, Carina Gottardi, Ana Beatriz, Maria Cecília, Fabiana, Juliana, pela troca de idéias, boa convivência, respeito e amizade.

Aos meninos: Roger, Luis Eduardo e André Nadvorny.

Ao departamento de virologia e à Clarissa Vaz pelo auxílio e incentivo na Biologia Molecular.

À amiga e colega Amanda Motta pela troca de idéias.

À Geovana Brenner pela verdadeira amizade e pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos meus familiares, pela segurança, torcida e compreensão.

A família Borba pelo apoio.

Ao meu grande amor, pelo companheirismo, paciência e apoio em todos os momentos.

## RESUMO

A aplicação de métodos de tipificação baseados na caracterização fenotípica e genotípica em vários pontos da cadeia de produção de suínos pode ser uma importante ferramenta para identificar a principal fonte de contaminação por *Salmonella* sp. A partir disso, o trabalho propôs tipificar uma coleção de 97 amostras de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium (ST) isolada de suínos levados ao abate em três diferentes frigoríficos no Rio Grande do Sul, por meio de fagotipificação, hibridização com IS200, resistência a antimicrobianos, amplificação da região *spvR*, amplificação de sequências repetitivas (rep-PCR) e PFGE. Paralelamente, os isolados de ST foram avaliados frente a dois desinfetantes (amônia quaternária e iodoform) pela técnica da diluição em tubo. Os isolados foram classificados em 12 fagotipos distintos, sendo o DT177 o mais frequentemente identificado. Houve o predomínio de um padrão único de hibridização com o IS200 e em apenas três isolados, a região *spvR* foi detectada. Um alto número de amostras resistentes à tetraciclina, sulfonamida e estreptomicina foi encontrado, sendo o perfil de resistência relacionado ao frigorífico de origem dos isolados. No rep-PCR, usando sequências iniciadoras para REP e ERIC, um único padrão de bandas foi gerado entre os isolados de ST. A análise por PFGE mostrou doze diferentes padrões de bandas. Sessenta e quatro isolados apresentaram um padrão idêntico no PFGE. Todas amostras foram inibidas pelo composto quaternário de amônio, na concentração recomendada pelo fabricante e numa concentração inferior à indicada. Frente ao iodoform, quatro amostras mostraram-se resistentes na concentração indicada e 59 na sub-concentração. A combinação da fagotipificação e do perfil de PFGE permitiu alcançar uma melhor discriminação das amostras, sendo essas técnicas consideradas as mais adequadas. Por outro lado, a presença de linhagens clonais parecem estar presentes na região, indicando possíveis pontos comuns de infecção.

**Palavras Chave:** *Salmonella* Typhimurium, IS200, rep-PCR, fagotipificação, PFGE, suínos

## **ABSTRACT**

*The identification of Salmonella contamination sources throughout the pork production chain can be achieved by genotypic and phenotypic characterization of isolates. Thus, the aim of this study was typing a set of 97 Salmonella enterica subsp. enterica ser. Typhimurium (ST) strains isolated from pigs slaughtered in three different slaughterhouses located in the State of Rio Grande do Sul, using phage typing, IS200 hybridization, antimicrobial susceptibility testing, spvR region amplification, repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR) and PFGE. Furthermore, ST strains were tested for the susceptibility to ammonium quaternary compounds and iodophor by the tube dilution test. ST strains were classified in 12 different phage types and DT177 was the most prevalent. A unique IS200 hybridization pattern predominated among the strains, and in three isolates the spvR region was detected. Most strains were resistant against tetracycline, sulfonamide and streptomycin. Resistance patterns were related to the slaughterhouse, where strains have been isolated. The rep-PCR, using REP and ERIC primers, demonstrated an unique pattern among the strains, while the PFGE method resulted in 12 different patterns. Sixty four strains presented a similar PFGE pattern. All strains were inhibited by the ammonium quaternary compound in the recommended dilution as well as in a higher dilution. Against the iodophor compound, used in the recommended dilution, four strains were resistant, while 59 were not inhibited when a higher dilution was tested. The association of phage typing and PFGE pattern resulted in a better strain discrimination, and was considered the most suitable for characterization of porcine Salmonella strains. Furthermore, clonal groups were identified among this set of strains, indicating possible common points in Salmonella transmission chain in southern Brazil.*

**Keywords:** *Salmonella Typhimurium, IS200, rep-PCR, phage typing, PFGE, pigs*

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2:**

TABELA 1	Antimicrobial resistance profile, phage type, presence of O5 antigen and IS200 pattern of <i>S. Typhimurium</i> strains isolated between 1999 and 2000 in slaughterhouse I.....	<b>60</b>
TABELA 2	Antimicrobial resistance profile, phage type, presence of O5 antigen and IS200 pattern of <i>S. Typhimurium</i> strains isolated in 2000 in slaughterhouse II.....	<b>61</b>
TABELA 3	Antimicrobial resistance profile, phage type, presence of O5 antigen and IS200 pattern of <i>S. Typhimurium</i> strains isolated between 2000 and 2001 in slaughterhouse III.....	<b>62</b>

### **CAPÍTULO 4**

TABELA 1	Caracterização por fagotipificação, presença de antígeno O5 e perfil de resistência a antimicrobianos de 40 linhagens de <i>Salmonella</i> Typhimurium provenientes de dois matadouros-frigoríficos de suínos do Rio Grande do Sul, no período de 2000 a 2001.....	<b>107</b>
TABELA 2	Tipificação molecular de <i>Salmonella</i> Typhimurium por fagotipificação e PFGE de 97 isolados de suínos levados ao abate no Rio Grande do Sul no período de 1999 a 2001.....	<b>108</b>

### **CAPÍTULO 5**

TABELA 1	Número de amostras de <i>Salmonella</i> Typhimurium sensíveis (inativadas) frente aos grupos químicos desinfetantes quaternário de amônio e iodoform, em duas concentrações de uso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.....	<b>125</b>
TABELA 2	Número de amostras de <i>Salmonella</i> Typhimurium sensíveis (inativadas), por tempo de contato, frente duas concentrações dos grupos químicos desinfetantes quaternário de amônio e iodoform - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.....	<b>126</b>

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2:

#### FIGURA 1

(a) Lanes A-E show the different IS200 hybridization patterns (A-E) of *S. Typhimurium* strains. Lane M contains the molecular weight marker Lambda DNA digested with *Hind*III Standard and lane SS44 contains *S. Abortusovis* strain. (b) Dendogram showing the results of the cluster analysis on the basis of IS200 patterns.....

63

### CAPÍTULO 3

#### FIGURA 1

(a) Padrão de bandas de ERIC-PCR de *Salmonella enterica* obtido com os oligonucleotídeos ERIC1R e ERIC2 (a). Linhas 1 e 12: marcador molecular- DNA Ladder 100bp (M); Linhas 2 a 5: padrão encontrado em isolados do G1, G2 e G3 (*S. Typhimurium*, padrão A); Linha 6: *S. enterica* sub. *enterica* O:6,8 (perfil B); Linha 7: *S. Bredeney* (perfil C); Linha 8: *S. Agona* (perfil D); Linha 9: *S. Panamá* (perfil E); Linha 10: *S. Derby* (perfil F); Linha 11: *S. Enteritidis* (perfil G). (b) Dendogramas mostrando a relação dos diferentes padrões. A análise da similaridade foi realizada usando o coeficiente de Dice e o agrupamento gearado por UPGMA.....

84

#### FIGURA 2

(a) Padrão de bandas de REP-PCR de *Salmonella enterica* obtido com os oligonucleotídeos REP 1R-I e REP2-I. (a). Linhas 1 e 12: marcador molecular- DNA Ladder 100bp (M); Linhas 2 a 5: padrão encontrado em isolados do G1, G2 e G3 (*S. Typhimurium*, padrão A); Linha 6: *S. enterica* sub. *enterica* O:6,8 (perfil B); Linha 7: *S. Bredeney* (perfil C); Linha 8: *S. Agona* (perfil D); Linha 9: *S. Panamá* (perfil E); Linha 10: *S. Derby* (perfil F); Linha 11: *S. Enteritidis* (perfil G). (b) Dendogramas mostrando a relação dos diferentes padrões. A análise da similaridade foi realizada.....

85

### CAPÍTULO 4

#### FIGURA 1

Padrões de Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) do DNA genômico de 97 *Salmonella Typhimurium* obtidos com a enzima de restrição *Xba*I. Linha 1 e 14 DNA de *Salmonella Typhimurium* LT2; linhas de 2 a 13 correspondem aos padrões diferentes na tabela 2 (a). Dendograma mostrando a relação entre os padrões. A análise da similaridade foi realizada usando o coeficiente de Dice e agrupadas por UPGMA (b) .....

109



## LISTA DE APÊNDICES

<b>APÊNDICE A</b>	Índice de Discriminação de Simpson e poder de discriminação das técnicas fenotípicas e genotípicas empregadas no presente estudo.....	<b>142</b>
<b>APÊNDICE B</b>	Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipificação, presença do antígeno O5, padrões de IS200 e padrões de PFGE de linhagens de <i>S. Typhimurium</i> isoladas entre 1999 e 2000 no matadouro-frigorífico I, II e III.....	<b>143</b>

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO 1</b>	
INTRODUÇÃO.....	<b>12</b>
REVISÃO DE LITERATURA.....	<b>14</b>
<b>2. CAPÍTULO 2</b>	
Phenotypic and molecular characterization of <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil.....	<b>48</b>
<b>3. CAPÍTULO 3</b>	
Perfil de REP e ERIC-PCR de amostras de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.....	<b>69</b>
<b>4. CAPÍTULO 4</b>	
Subtipificação de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium isoladas de suínos .....	<b>87</b>
<b>5. CAPÍTULO 5</b>	
Sensibilidade e resistência de amostras de <i>Salmonella</i> Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil, frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofor.....	<b>111</b>
<b>6. CAPÍTULO 6</b>	
DISCUSSÃO GERAL.....	<b>128</b>
<b>7. CONCLUSÕES FINAIS .....</b>	<b>140</b>
<b>8. APÊNDICES</b>	<b>141</b>

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA**

## 1 INTRODUÇÃO

A suinocultura brasileira vem crescendo consideravelmente nos últimos tempos e o mercado consumidor vem exigindo uma comprovada qualidade sanitária desses produtos. Com isso, significativas mudanças na cadeia de produção estão sendo implantadas entre as quais o controle à infecção por *Salmonella* em suínos. Esta evolução tem por objetivo levar o setor a uma maior competitividade no mercado interno e externo.

A *Salmonella* sp. é um dos microrganismos mais envolvidos em toxinfecções alimentares e sua presença em carcaças e derivados de suínos representa um sério risco à saúde pública, além de gerar barreiras para a exportação. Portanto, as medidas de controle da infecção nos rebanhos são de relevância e devem ser baseadas em resultados de estudos epidemiológicos.

Nas granjas, os suínos podem ser expostos a uma ampla variedade de sorovares de *Salmonella* que, na maioria das vezes, não causam sintomatologia clínica. No entanto, permanecem no animal, tornando-os portadores assintomáticos, capazes de disseminar o microrganismo ao longo da cadeia produtiva. Epidemiologicamente, estes indivíduos são importantes pela difícil identificação e o comprovado envolvimento na contaminação cruzada de carcaças e subprodutos durante o abate. A quantidade de animais portadores que chegam ao abate é um dos principais pontos críticos para obtenção de um produto final de qualidade. Esforços para controlar a causa deste problema são dificultados pela informação insuficiente sobre a origem da contaminação e do número de animais portadores.

Através de estudos realizados no Rio Grande do Sul, constatou-se que o número de suínos portadores de *Salmonella* sp., abatidos sob Inspeção Federal, alcançou níveis expressivos, representando uma fonte de contaminação para outros animais e para o produto final. Os sorovares mais freqüentemente isolados nestes estudos foram Typhimurium e Bredeney.

Devido à significância desse patógeno na granja e no abatedouro, faz-se necessária a padronização e a escolha de técnicas que permitam a tipificação de amostras e sirvam como ferramenta para rastrear isolados em estudos epidemiológicos.

Apesar da existência de métodos tradicionais de detecção de *Salmonella* é necessária a utilização de outros métodos de caracterização a fim de obter um melhor entendimento da relação patógeno - suíno na cadeia de produção. A escolha de técnicas

adequadas permitirá caracterizar e discriminar linhagens de *Salmonella* tanto na cadeia de produção de suínos como em surtos de infecções humanas, contribuindo para a rastreabilidade desta bactéria.

A partir disso, o trabalho propôs tipificar uma coleção de *Salmonella* Typhimurium isolada de suínos levados ao abate em frigoríficos no Rio Grande do Sul, por meio de diferentes técnicas fenotípicas e genotípicas, cujos resultados serão apresentados em quatro artigos científicos abaixo identificados:

1. Caracterização de amostras de *S.Typhimurium* isoladas usando fagotipificação, perfil de resistência a antimicrobianos, seqüência de inserção IS200 e detecção da região *spvR*.

2. Aplicação da técnica da reação em Cadeia da Polimerase para amplificação de seqüências repetitivas (rep-PCR) na discriminação das linhagens de *S.Typhimurium* isoladas de suínos.

3. Investigação da diversidade clonal das linhagens de *S.Typhimurium* através da técnica de PFGE, associada ao perfil de resistência a antimicrobianos e fagotipificação.

4. Monitoramento da sensibilidade das amostras de *S.Typhimurium* frente aos desinfetantes quaternário de amônio e iodoform.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Características Gerais

O gênero *Salmonella* é membro da família Enterobacteriaceae que compreende bacilos Gram negativos não produtores de esporos. A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios com exceção dos sorovares Gallinarum e Pullorum (HOLT, J.G. et al.,1994). São anaeróbios facultativos, reduzem nitratos a nitritos, fermentam glicose e geralmente não fermentam a lactose ou o fazem lentamente (CLARKE, R.C.; GYLES, C.L.,1993). A *Salmonella* sp. produz ácido e freqüentemente gás (exceto *S. Typhi*) a partir de D-glicose e outros carboidratos. São indol negativas, produzem ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A uréia não é hidrolisada e são capazes de descarboxilar lisina e ornitina (HOLT, J.G. et al.,1994). Resistem à dessecação e ao congelamento, possuindo a capacidade de sobreviver no ambiente por anos (WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J., 1992). O pH ótimo de multiplicação é próximo de 7,0 e a temperatura ideal é de 35-37°C (FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M., 1996), porém possuem uma faixa de temperatura de crescimento que varia de 7°C a 45°C, (WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J., 1992).

De acordo com o sistema do CDC o gênero *Salmonella* contém duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, L.; GHEESLING, L.L., 2003; Yan, S.S. et al., 2003). Das duas espécies de *Salmonella*, 99% dos sorovares estão agrupadas dentro da espécie *enterica*, e aproximadamente 60% deles pertence à subespécie *enterica* (POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, L.; GHEESLING, L.L., 2003). Os sorovares da subespécie *enterica* são nomeados, sendo seu nome escrito não italizado e com a primeira letra maiúscula, por exemplo, sorovar Typhimurium. Para os sorovares das demais subespécies e para *S. bongori* são utilizadas fórmulas antigênicas. Na primeira citação de um sorovar o gênero é seguido pela palavra sorovar (Ex., *Salmonella* sorovar Typhimurium ou ser. Typhimurium), subseqüentemente o nome poderá ser escrito com o gênero seguido diretamente pelo nome

do sorovar (Ex. *Salmonella* Typhimurium) (BRENNER, F.W. et al., 2000; POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W., 2000).

Atualmente, existem mais de 2.500 sorovares identificados de *Salmonella* sp. com vasta distribuição na natureza (POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, L.; GHEESLING, L.L., 2003), podendo estar presentes no trato gastrointestinal de diversos animais, incluindo peixes, répteis, pássaros e mamíferos (HIRSH, D.C., 1990; CLARKE, R.C.; GYLES, C.L., 1993). O número de sorovares de *Salmonella* vem aumentando a cada ano, por exemplo, em 1999, 26 novos sorovares foram incluídos, em 2000 e 2001, 12 e 22 novos sorovares, respectivamente, foram identificados e acrescentados no esquema de Kauffmann-White (POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W., 2000; POPOFF, M.Y. et al., 2001, POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, L.; GHEESLING, L.L., 2003).

A presença ou ausência do antígeno O5 é usada para diferenciar a *Salmonella* sorovares Typhimurium (a qual possui o antígeno O5) e sua variante sorológica Copenhagen (a qual falta o antígeno O5). A fagotipificação distingue o sorovares Typhimurium de sua variante baseado na susceptibilidade com um grupo de bacteriófagos (RABSCH, W. et al., 2002).

## 2.2 Patogenia

A entrada de organismos patogênicos, como a *Salmonella*, em um hospedeiro pode ocorrer através da pele danificada, pelo trato digestivo, pelo trato respiratório e pela conjuntiva (FINLAY, B.B.; FALKOW, S., 1989). As secreções orofaríngeas podem transmitir o microrganismo através de aerossóis, mas a via oro-fecal é considerada como a principal via na transmissão de *Salmonella* sp. (SCHWARTZ, K.J., 2000).

Todos os sorovares de *Salmonella* são ditos patogênicos ou potencialmente patogênicos para humanos e/ou animais, entretanto existe uma diferença na virulência entre os diferentes sorovares (FINLAY, B.B.; FALKOW, S., 1989; LAX, A.J. et al., 1995).

O hospedeiro possui fatores de defesa, como a indução da elevação da acidez gástrica, a ação da bile, o peristaltismo, o ambiente anaeróbio, a mucosa intestinal, as lisozimas, as lactoferrinas e ainda, a interferência da microbiota que pode dificultar a colonização pelo microrganismo. Uma alteração destes fatores, quando na presença de um organismo patogênico, pode ocasionar doença, tornando-o apto para sobreviver e

multiplicar (FINLAY, B.B.; FALKOW, S., 1989; CLARKE, R.C.; GYLES, C.L.,1993; RYCHLIK, I.; BARROW, P.A., 2005). Sabe-se que, após a infecção, a maioria da população de *Salmonella* sp. é eliminada pelo sistema imune do hospedeiro, mas uma proporção pode sobreviver, tornando o hospedeiro um portador ou gerando uma infecção crônica (CLARKE, R.C.; GYLES, C.L.,1993).

Os principais sinais clínicos associados com a infecção por *Salmonella* em humanos são enterite, febre e gastroenterite. A forma mais comum de apresentação clínica é a gastroenterite com náusea, vômito e diarreia com ou sem febre (POPPE, C. et al., 1998; OHL, M.E.; MILLER, S.I., 2001).

Os animais infectados frequentemente tornam-se excretores assintomáticos e representam um risco para os demais, pois podem contaminar seu ambiente e elevado número de animais suscetíveis. Sorovares como Typhimurium e Enteritidis, embora capazes de causar doença sistêmica em um amplo grupo de animais, geralmente induzem a uma gastroenterite autolimitante (UZZAU, S. et al., 2000).

Após a adesão e proliferação no intestino delgado, o organismo invade a mucosa intestinal não somente pela destruição da camada epitelial, mediada por produtos bacterianos, mas também pelo transporte através do epitélio intacto. Na mucosa intestinal vários tipos de células podem ser encontradas como as células Paneth, células M, enterócitos absorptivos e as células crípticas. As células M, especialmente as agrupadas nas placas de Peyer, e os enterócitos absorptivos, em menor parcela, são considerados como as principais portas de entrada da *Salmonella*, principalmente Choleraesuis, Dublin e Typhimurium (van ASTEN, J.A.M. et al., 2005).

Os sorovares de *Salmonella* clinicamente associados com enterite induzem uma resposta secretória no epitélio intestinal e induzem um recrutamento e passagem de neutrófilos para o interior do lúmen do intestino. Uma vez atravessando o epitélio intestinal, a *Salmonella* encontra outros obstáculos de imunidade natural, os macrófagos. Os sorovares que causam infecção sistêmica entram nos macrófagos e ativam os mecanismos de virulência que permitem a evasão das funções microbicidas dos fagócitos, permitindo sobreviver e replicar no ambiente intracelular. A migração de fagócitos infectados para outros órgãos do sistema retículo-endotelial facilita a disseminação da bactéria no hospedeiro (OHL, M.E.; MILLER, S.I., 2001).



A *Salmonella* Typhimurium, segundo sorovares mais isolado de suínos doentes, geralmente causa uma infecção localizada sob forma de enterocolite (SALYERS, A.A.; WITT, D.D.,1994; SCHWARTZ, K.J., 2000). A *Salmonella* Dublin e a *Salmonella* Enteritidis, eventualmente, estão envolvidas com doença em suínos (SCHWARTZ, K.J., 1991). Algumas espécies possuem maior capacidade de causar septicemia do que outras, podendo ou não causar diarreia e/ou destruição das células alvo (HIRSH, D.C., 1990).

GRAY, J.T. et al. (1996) pesquisaram o efeito da dose na resistência e na resposta imune de suínos infectados com *Salmonella* Choleraesuis e observaram que, para causar doença clínica, era necessária uma dose de  $10^9$  células de *Salmonella* Choleraesuis, enquanto que uma dose de  $10^6$  determinaria depressão e letargia. Segundo QUINN, P.J. et al. (1994), a dose de *Salmonella* sp. para dar origem a uma infecção em humanos é de  $10^3$  a  $10^8$  células, variando conforme o tipo de substrato, o estado imunológico do indivíduo e o sorovares da bactéria. JUBB, K.V.F. et al. (1985) descreveram que, para infectar animais domésticos, necessita-se de uma dose mínima de  $10^7$  a  $10^9$  células. O microrganismo associado com alimentos de alto teor lipídico é protegido do pH estomacal e, assim, a dose para ocorrer a infecção será mais baixa (LAX, A.J. et al.,1995).

A maioria dos genes de virulência está agrupada em regiões distribuídas no cromossoma do gênero *Salmonella*, designadas de ilhas de patogenicidade (SPI). Sugere-se que estes genes foram adquiridos de outros gêneros bacterianos através de transferência horizontal. A aquisição desses genes de virulência pode ter levado a um aumento da patogenicidade da *Salmonella* sp. durante a evolução. Estes genes muitas vezes contêm múltiplas funções necessárias para a virulência (OHL, M.E.; MILLER, S.I., 2001, van ASTEN, A.J.A.M.; van DIJK, J.E., 2005). Até recentemente um total de cinco SPIs tinham sido identificadas (denominadas SPI-1 a SPI-5). A ilha 1 (SPI-1) é necessária para a invasão, enquanto as SPI 2, 3 e 4 são necessárias para a multiplicação e sobrevivência da bactéria dentro do hospedeiro. A SPI-5 media a inflamação e secreção de cloro, caracterizando a fase enterica da doença (MARCUS, S.L. et al., 2000). Atualmente, a literatura relata mais cinco regiões designadas como SPIs (SPI-6 a SPI-10), estas estão mais envolvidas com a codificação de fímbrias, resistência a bacteriocinas e produção de toxinas (van ASTEN, A.J.A.M.; van DIJK, J.E., 2005).

Múltiplos genes são essenciais na patogenicidade da salmonelose sistêmica incluindo genes abrigados em grandes plasmídeos de virulência denominados de SAPs (abreviação para “Serotipe-Associated Plasmids”) Os SAPs codificam um locus associado à virulência denominado de *spv* (GULIG, P.A. et al., 1993; OLSEN, J.E. et al., 2004). O locus *spv* contém cinco genes (*spvR*, *A*, *B*, *C*, e *D*) com *spvA,B,C,D* organizado como um operon. Estes genes são expressos durante a fase estacionária e durante o estágio intracelular da infecção (van ASTEN, A.J.A.M.; van DIJK, J.E., 2005). A fase estacionária induz o fator sigma RpoS, importante na regulação do operon *spv*, que é essencial para a adaptação ao estresse (LIBBY, S.J. et al., 1997; AABO, S.; BROWN, D.J.; OLSEN, J., 2000; UZZAU, S. et al., 2000). O promotor *spv* do plasmídeo de virulência da *Salmonella* é somente ativo quando os níveis de RpoS aumentam na célula (LESNICK, M.L. et al., 2001).

O produto do *spvR*, o SpvR, que é uma proteína regulatória essencial para a expressão dos outros genes *spv*, liga-se aos promotores *spvR* e *spvA* e controla o operon *spvABCD*, para isso é necessário o fator sigma RpoS para uma expressão (van ASTEN, A.J.A.M.; van DIJK, J.E., 2005). O *spvB* junto com o *spvC* é suficiente para conferir virulência para *S. Typhimurium* (van ASTEN, A.J.A.M.; van DIJK, J.E., 2005).

A introdução desses genes, não associados com o SAPs, não aumenta a virulência em sorovares de *Salmonella* que não podem expressar produtos do gene *spv* (OLSEN, J.E. et al., 2004).

A maioria dos sorovares de *Salmonella*, incluindo *S. Typhimurium* e os sorovares adaptados a um hospedeiro muitas vezes carregam o SAP (AABO, S.; BROWN, D.J.; OLSEN, J., 2000; OLSEN, J.E. et al., 2004), aumentando a virulência dessas linhagens (LIBBY, S.J. et al., 1997). Alguns fagotipos de *Salmonella Typhimurium* podem não possuir o SAP ou perder durante a evolução, demonstrando, assim, baixa virulência. Este fato indica uma diferença na habilidade dos fagotipos em adquirir o plasmídeo de virulência (UZZAU, S. et al., 2000; OLSEN, J.E. et al., 2004). Pelo menos seis sorovares de *Salmonella* (*Abortusovis*, *Choleraesuis*, *Dublin*, *Enteritidis*, *Gallinarum/Pullorum* e *Typhimurium*) podem carregar o plasmídeo de virulência. Estes plasmídeos variam em tamanho, por exemplo, *S. Choleraesuis*, 50-110 Kb; *S. Esteritidis*, 60Kb e *S. Typhimirium*, 90-95 KB (van ASTEN, A.J.A.M.; van DIJK, J.E., 2005).

### 2.3 Epidemiologia

O amplo número de sorovares de *Salmonella* sp. distribuído na natureza pode ocasionar infecções entéricas e sistêmicas (ESPER, M.R.N.R. et al., 1998). A transmissão pode acontecer entre animais, entre humanos e de animais para humanos (CLARKE, R.C.; GYLES, C.L., 1993). Vários sorovares de *Salmonella* são adaptados a um hospedeiro específico, como por exemplo, o Typhi aos humanos, o Choleraesuis aos suínos e o Dublin aos bovinos (SCHWARTZ, K.J., 2000). Apesar de adaptados à determinada espécie animal, os sorovares citados podem, sob condições especiais, também causar sérias doenças em humanos (BLAHA, T., 1997).

Outros sorovares, como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Anatum e *Salmonella* Newport, podem infectar um amplo número de hospedeiros que passam a ser importantes fontes de disseminação do agente (HIRSH, D.C., 1990; RABSCH, W. et al., 2002). Um exemplo disto, é o sorovar Typhimurium que, por ser um microrganismo com ampla distribuição, torna-se de mais difícil eliminação em um rebanho de suínos, quando comparado com o sorovar Choleraesuis, mais adaptado a este hospedeiro (WILCOCK, B.P. et al., 1976).

A transmissão dos sorovar de *Salmonella* sp. adaptados ao humano ocorre, geralmente, pela água e alimentos contaminados com fezes humanas, o que está associado às deficientes condições sanitárias (CALZADA, C.T. et al., 1984). No caso dos sorovares de *Salmonella* não-adaptados, são especialmente os alimentos de origem animal, assim como aves, ovos, carnes e laticínios, as fontes mais importantes para a infecção de humanos (ZEBRAL, A.A.; FREITAS, C.A.; HOFER, E., 1974; YAN, S.S. et al., 2003).

A contaminação cruzada, a falta de higiene na preparação do alimento e a estocagem inadequada, permitindo que o microrganismo se multiplique até atingir doses infectantes, são fatores de risco envolvidos com a infecção alimentar (SOJKA, W.J.; GITTER, M., 1961; GIBSON, E.A., 1969; RUBINO, J.R., 1997).

*S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* foram os sorovares mais freqüentemente isolados em estudos epidemiológicos (BORREGO, J. et al., 1992; RIVERA, M.J. et al., 1991) e têm sido os mais importantes causadores de doenças transmitidas por alimentos em humanos (LAX, A.J. et al., 1995).

Entre os sorovares mais freqüentemente isolados em episódios de infecção alimentar em humanos, no Brasil, encontram-se Enteritidis, Typhimurium, Bredeney e Tennessee (LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J.A.; FALCÃO, D.P., 1985; CAUDURO, P.F.; MEZZANI, A.; DIAS, C.A.G., 1986; ESPER, M.R.N.R. et al., 1998; DIAS, R.S.; CARMO, L.S.; SILVA, M.C.C., 1999; JAKABI, M. et al., 1999, GEIMBA, M.P. et al., 2004).

Em estudos realizados no Rio Grande do Sul, em suínos abatidos sob Inspeção Federal, os sorovares mais freqüentemente encontrados foram Typhimurium, Bredeney e Panama (BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M., 2004; CASTAGNA, S.M.F. et al. 2004; BANDEIRA, R.M., 2003).

A salmonelose é uma doença infecciosa importante encontrada nas criações de suínos, apresentando-se como uma septicemia aguda, enterite aguda ou crônica, ou como uma forma clínica inaparente (SOBESTIANSKY, J. et al., 1999). A forma da infecção depende do sorovar de *Salmonella* ingerida, da dose infectante e do estado físico do hospedeiro, pois animais cronicamente doentes ou debilitados são mais suscetíveis à infecção (MORSE, E.V.; DUNCAN, M.A., 1974; HIRSH, D.C., 1990).

A salmonelose é considerada como uma zoonose importante, pois pode entrar na cadeia produtiva contaminando carcaças e seus produtos (WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J., 1992; ESPER, M.R.N.R. et al., 1998; YAN, S.S. et al., 2003). Como decorrência disso, possui um significado econômico mundial, representando também um sério problema de saúde pública (CALZADA, C.T. et al., 1984).

São fontes relevantes na disseminação do microrganismo para os suínos e derivados, o contato com as fezes de animais contaminados, a inadequada limpeza e desinfecção das baias, a introdução de animais portadores, a entrada de ração contaminada com *Salmonella* sp. na granja, o transporte e a baia de espera (LINTON, A.H., 1979; HIRSH, D.C., 1990; SOBESTIANSKY, J. et al., 1999; SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A., 2001). É provável que os roedores atuem como reservatórios para linhagens de *Salmonella* ajudando a manter e propagar a infecção (PASMANS, F. et al., 2004). A fonte exata da contaminação por *Salmonella* nos suínos e seus derivados não é facilmente descoberta, podendo ser desde a granja até o abate dos animais (SWANENBURG, M.; KEUZENKAMP, D.A.; SNIJDERS, J.M.A., 1998).

Para isso alguns estudos foram realizados com o intuito de descobrir qual fase da cadeia de produção mais contribuiria para a contaminação da carne suína. Na Holanda, SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; SNIDERS, J.M.A. (2001), investigaram toda a cadeia produtiva através de técnicas sorológicas, bacteriológicas e moleculares e concluíram que a granja era a fonte mais importante para a contaminação dos animais (fígado, tonsilas, linfonodos mesentéricos e fezes), enquanto as baias de espera eram a fonte de contaminação para os suínos originados de rebanhos soro-negativos. A higiene da indústria e na linha de abate foram os principais fatores de risco para a contaminação da carcaça e de derivados. GEBREYES, W.A. et al (2004) aplicaram PFGE e resistência a antimicrobianos para comparar o papel do transporte na disseminação de linhagens de *Salmonella* multi-resistentes e concluíram que a *Salmonella* pode sobreviver à limpeza dos caminhões, permitindo a infecção de subseqüentes grupos de suínos. SILVA, L. et al. (2003) demonstraram a importância da terminação como ponto crítico na infecção por *Salmonella* quando acompanharam um lote de suínos durante todas as fases zootécnicas num sistema de produção no Rio Grande do Sul. SCHWARZ, P. et al. (2005) compararam os resultados de sorologia e isolamento bacteriológico de *Salmonella* de conteúdo intestinal de suínos abatidos em uma agroindústria no sul do Brasil. Este estudo demonstrou que as fontes mais importantes, para este sistema de produção, foram as granjas produtoras de suínos. WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J. (1992), DAVIES, P.R. et al. (1998); LETELLIER, A.; MESSIER, S.; QUESSY, S. (1999) já haviam relatado que o primeiro ponto crítico de contaminação dos animais e carcaça por *Salmonella* é a granja, mais precisamente o índice de portadores presentes.

Estudos enfatizando a epidemiologia de animais assintomáticos em nível de granja podem levar a um melhor entendimento do ciclo da contaminação de *Salmonella* nos suínos. Portanto, é possível dizer que a melhor maneira de reduzir o nível de carcaças contaminadas na indústria, seria identificar as fontes de contaminação e controlar o patógeno em todos os estágios de produção (CARLSON, A.R.; BLAHA, T, 1998; LETELLIER, A.; MESSIER, S.; QUESSY, S. et al., 1999).

A aplicação de métodos de tipificação baseados na caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* em vários pontos da cadeia de produção de suínos pode ser uma importante ferramenta para identificar a principal fonte de contaminação

(SWANENBURG, M.; KEUZENKAMP, D.A.; SNIJDERS, J.M.A., 1998; WEIGEL, R.M. et al., 2001)

#### 2.4. Métodos de Tipificação

A classificação de espécies é de grande importância para um bom diagnóstico bacteriológico e constitui-se numa informação epidemiológica. No entanto, métodos de tipificação baseados na análise de características fenotípicas e genotípicas podem ser uma ferramenta útil para estudos epidemiológicos (BORREGO, J. et al., 1992).

Os métodos de tipificação são baseados na caracterização fenotípica e genotípica do organismo a ser analisado. As técnicas, baseadas nos métodos fenotípicos mais utilizadas nas investigações epidemiológicas são a sorotipificação, a fagotipificação e a resistência a antimicrobianos (THRELFALL, E.J.; FROST, J.A., 1990; LAILLER, R. et al, 2002; YANG, S.J. et al., 2002). Quando diferentes técnicas conseguem diferenciar linhagens isto indica que os isolados são originados de diferentes clones (OLSEN, J.E. et al., 1993).

A análise de *Salmonella* por métodos de tipificação molecular tem sido útil para a caracterização de linhagens de diferentes sorovares como *S. Typhimurium* (STANLEY, J.; BAQUAR, N.; THRELFALL, J., 1993; SCHWARZ, S.; LIEBISCH, B., 1994; MILLEMANN, Y. et al., 1995). Diferentes métodos têm sido utilizados para esta caracterização, entre elas, análise do perfil de plasmídeos, ribotipificação, elemento de inserção IS200, PCR de seqüências repetitivas (rep-PCR), Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) e Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) (LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S., 1996; LANDERAS, E., 1996; BURR, M.D. et al., 1998; SANDVANG, D. et al., 2000; MILLEMANN, Y. et al., 2000; WEIGEL, R.M. et al., 2001; LAILLER, R. et al., 2002; TSEN, H.Y.; LIN, J.S.; HSIEN, H.Y., 2002). A caracterização molecular vem sendo usada por vários pesquisadores a fim de determinar a relação epidemiológica de linhagens multiresistentes de *S. Typhimurium* (KARIUKI, S. et al., 2000; SOTO, S.M. et al., 2001; LING, M.L. et al., 2002; TSEN, H.Y.; LIN, J.S.; HSIEN, H.Y., 2002).

Com o desenvolvimento dos métodos moleculares e com o uso de métodos alternativos, tem sido possível alcançar um alto poder de discriminação e uma rápida identificação de microrganismos patogênicos (BAUDART, J. et al., 2000).

#### 2.4.1 MÉTODOS FENOTÍPICOS

O fenótipo refere-se às propriedades reais expressas, manifestação do genótipo, como a capacidade do organismo de realizar uma determinada reação química. A maioria das propriedades da célula deriva das estruturas e funções de suas proteínas. Nos microrganismos, a maioria das proteínas é enzimática ou estrutural (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; SASE, C.L., 2005).

A adaptação a um grande número de diferentes nichos evolucionários tem levado a um alto grau de diversidade fenotípica e genotípicas em linhagens de *Salmonella* sp. Variações genéticas ocorrem em genes que codificam estruturas assim como o LPS, flagelos, fimbrias e genes de virulência codificando fatores que modificam a fisiologia da célula ou protegem a bactéria de sistemas antimicrobianos do hospedeiro. A estrutura da superfície não somente afeta a virulência da bactéria, mas também são alvos para o sistema imune do hospedeiro, resultando numa pressão seletiva para gerar polimorfismo genético (FIERER, J.; GUINEY, D.G., 2001).

Métodos de tipificação fenotípicos ainda são considerados de grande importância para a investigação de bactérias e de casos esporádicos de salmonelose. A estabilidade, a reprodutibilidade e a tipicidade desses métodos são considerados altos para *Salmonella*, pois resultados obtidos sobre um longo período podem ser comparados diretamente. No entanto, para a sorotipificação e para a fagotipificação é preciso uma produção padronizada e um controle de qualidade dos soros e dos fagos (OLSEN, J.E. et al., 1993).

##### *a. Sorotipificação*

A sorotipificação de *Salmonella* é a técnica mais comumente usada para diferenciar linhagens. Esta técnica separa as linhagens baseadas no seu antígeno somático (O), antígeno capsular (Vi, se presente) e antígeno flagelar (H) dentro de distintos sorovares (Olsen, J.E. et al., 1993). Os antígenos O, associados com a parede celular e de constituição polissacarídica, caracteriza os sorogrupos de *Salmonella* e são designados por números arábicos (EKPERIGIN, H.E.; NAGARAJA, K.V., 1998). Os antígenos flagelares, associados aos flagelos peritríquios, podem ocorrer em duas fases, denominadas 1 e 2 (CAMPOS, L.C., 1999). A fase 1 é indicada por letras minúsculas de “a” a “z”, aparecendo

esta última letra, algumas vezes, associadas a expoentes numéricos, por serem os antígenos flagelares mais numerosos que as letras do alfabeto. A fase 2 é designada por numerais arábicos (1-12) (OLD, D.C.; THRELFALL, E.J., 1998; CAMPOS, L.C., 1999). O antígeno Vi é encontrado apenas em três sorovares: *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin* (CAMPOS, L.C., 1999). A conversão do sorovar pode ocorrer, em casos raros, devido à infecção por fagos ou plasmídeos (OLSEN, J.E. et al., 1993). O esquema de sorotipificação do gênero *Salmonella* utilizado é o de Kauffmann-White (POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L., 2003).

Do ponto de vista de segurança dos alimentos os sorovares Enteritidis e Typhimurium são os mais importantes, uma vez que causam a maioria dos surtos de doenças transmitidas por alimentos (OLSEN, J.E. et al. 1993; BURR, M.D. et al. 1998; AHMED, R. et al., 2000; ANG-KUÇUKER, M. et al., 2000; LING, M.L. et al., 2002; TSEN, H.Y.; LIN, J.S.; HSIEN, H.Y., 2002; GUDMUNDSDOTTIR, S.; HARDARDOTTIR, H.; GUNNARSSON, E., 2003). Entretanto, outros sorovares tem sido relacionados com surtos de salmonelose, principalmente aqueles em que alimentos que não são de origem animal estão envolvidos (SIVAPALASINGAM, S. et al., 2003; WERBER, D. et al., 2005).

A sorotipificação é a primeira ferramenta de tipificação em investigações de surtos (OLSEN, J.E., 1993; BURR, M.D. et al., 1998). No entanto, ela é inadequada quando utilizada isoladamente em estudos epidemiológicos, uma vez que alguns sorovares participam na maior percentagem de surtos investigados (JOHNSON, J.R., 2001; CHMIELEWSKI, R. et al., 2002). Para uma precisa tipificação é necessário aplicar outras técnicas mais avançadas (OLSEN, J.E. et al., 1993).

#### *b. Fagotipificação*

A fagotipificação utiliza a habilidade seletiva do bacteriófago de infectar certas linhagens de *Salmonella*. Diferentes bacteriófagos são aptos para seletivamente infectar isolados de *Salmonella* devido às diferenças no fago e receptor do fago presente na superfície da bactéria. Quando um apropriado receptor do fago é localizado na superfície da célula, ocorre a infecção da bactéria e a lise da célula (OLSEN, J.E. et al., 1993; YAN, S.S. et al., 2003).



O sistema da fagotipificação de *S. Typhimurium* é baseado numa coleção de fagos, os quais foram propagados num hospedeiro do sorovares Typhimurium (SCHMIEGER, H., 1999). O primeiro esquema de fagotipificação, estabelecido em 1943 por FELIX, A.; CALLOW, B.R. distinguiu 20 tipos de *S. Typhimurium* com 11 fagos. O segundo esquema, estendido por CALLOW, B.R. (1959), distinguiu 34 tipos com 29 fagos. ANDERSON, E.S. et al., (1977) refinou o esquema aumentando o número de tipos para 207, com 34 fagos, este é amplamente utilizado, sendo chamado de esquema de fagotipificação de Anderson. Muitas *S. Typhimurium* que não foram tipificáveis pelo esquema antigo renderam padrões claros com o novo (CALLOW, B.R.,1959), assim designações numéricas definitivas (DT) foram dadas em adição a designações provisórias (PT) (ANDERSON, E.S. et al., 1977).

A fagotipificação para os demais sorovares de *Salmonella* é baseada no esquema de Anderson, descrito para *S. Typhimurium*, por exemplo, WARD, L.R.; AS, J.DH.; ROWE, B. et al., (1987) descreveram um esquema de fagotipificação para *S. Enteritidis*, o qual diferenciou 27 tipos usando 10 fagos, sendo este esquema utilizado até hoje.

Como na sorotipificação, o processo da conversão de fagotipos, pela aquisição ou perda de fagos lisogênicos, pode ocorrer pela aquisição de diferentes plasmídeos e por mutações no gene codificando para a síntese do Lipopolissacarídeo (OLSEN, J.E. et al., 1993; KARIUKI, S. et al., 2000).

A fagotipificação tem provado ser uma técnica rápida, exata, com um custo relativamente baixo e altamente discriminatória para distinguir entre linhagens de *Salmonella* (ANDERSON, E.S. et al., 1977; THRELFALL, E.J.; FROST, J.A.,1990; WARD, L.R.; THRELFALL, E.J., 2001). É uma técnica que exige experiência e uma grande coleção de fagos, assim, pode ser implementada somente em laboratórios nacionais de referência (OLSEN, J.E. et al., 1993).

É extremamente valiosa para diagnóstico, e há muitos anos vem auxiliando em estudos epidemiológicos envolvendo *S. Typhimurium* (ANDERSON, E.S.; GALBRAITH, N.S.; TAYLOR, C.E.D., 1961; ANDERSON, E.S. et al, 1977; MARKOWSKY, G.; GERSHMAN, M.; HUNTER, J., 1992). Em 1978, ANDERSON, E.S.; WARD, L.R.; SAXE, M.J. combinaram a fagotipificação com biotipificação (baseado na técnica relatada por DUGUID, J.P. et al. (1975), particularmente utilizando os testes com *d*-, *l*- e *m* -

tartarato de isolados de *S. Typhimurium* para avaliar a filogenia e propagação de linhagens epidêmicas. Diferentes biotipos foram encontrados dentro do mesmo fagotipo, provando ser útil para distinguir linhagens de diferentes biotipos dentro do mesmo fagotipo e para confirmar a relação clonal entre culturas isoladas de fontes diversas.

Dentro do sorovar *Typhimurium*, o fagotipo DT104 tem sido um dos mais relatados, sendo alvo de monitoramento principalmente devido a sua característica de multiresistência a antimicrobianos (KHAN, A. et al., 2000; BEAUDIN, B. et al., 2002; LIEBANA, E. et al., 2002; LING, M.L. et al., 2002). Este fagotipo foi primeiramente encontrado em isolados de bovinos e acredita-se que tenha sofrido uma disseminação mundial. Hoje, é o fagotipo mais encontrado em isolados de suínos (BEAUDIN, B. et al., 2002).

Quando associada a outros métodos de tipificação, a fagotipificação manteve sua capacidade de discriminação e foi capaz de agrupar linhagens de uma fonte comum (HILTON, A.C.; BANKS, J.G.; PENN, C.W., 1996; BORREGO, J. et al., 1992). A sensibilidade e a estabilidade da fagotipificação faz desta técnica muito atrativa para determinar a propagação do sorovar *Typhimurium* ao longo do tempo (RABSCH, W., 2002). Assim, a combinação desta técnica com outros métodos de tipificação pode ser usada para determinar a origem da infecção.

LACONCHA, I. et al. (1998) confirmaram que a combinação da fagotipificação com PFGE e RAPD aumentou o poder de discriminação de linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de infecções em humanos, ajudando, assim, na investigação epidemiológica de surtos alimentares.

A partir disso, métodos fenotípicos tradicionais como a sorotipificação e a fagotipificação conservam um papel importante na investigação de casos esporádicos de salmonelose (YAN, S.S. et al., 2003).

### *c. Sensibilidade a Antimicrobianos*

O surgimento de bactérias resistentes a antimicrobianos tem recebido considerável atenção nos últimos anos devido às falhas que podem ocasionar no tratamento tanto em animais como em humanos (YAN, S.S. et al., 2003). Entre os antimicrobianos de uso comum na medicina veterinária e humana, encontram-se a penicilina, cefalosporinas,

tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglicosídeos, espectinomicina, macrolídeos, nitrofuranos, sulfonamidas, trimetoprima, polimixinas e quinolonas (TEUBER, M., 2001).

A maioria dos casos de gastroenterite humana causada por *Salmonella* sp. não requer terapia com antimicrobianos, no entanto, algumas infecções invasivas, podem ser fatais, particularmente para pacientes imuno-comprometidos. Nestes casos a terapia com antimicrobianos é necessária (DAVIS, M.A.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E., 2002).

Alguns antimicrobianos usados para o tratamento de infecções em humanos são utilizados também como promotor de crescimento, tratamento e prevenção de doenças em suínos. O uso desses antimicrobianos em animais pode representar um risco de seleção de linhagens resistentes em populações bacterianas que podem circular em animais e humanos (FEDORKA-CRAY, P.J. et al., 1999; BEAUDIN, B.A. et al., 2002; DAVIES, P.R. et al., 2002).

O perfil de resistência a antimicrobianos tem sido usado como uma informação adicional no processo de tipificação de linhagens bacterianas. Ao lado disso, o monitoramento da resistência fornece dados sobre a situação das populações bacterianas em diferentes áreas geográficas e ao longo do tempo (FEDORKA-CRAY, P.J. et al., 1999; LANGLOIS, B.E.; DAWSON, K.A., 1999; LAILLER, R. et al., 2002; GEBREYES, W.A. et al., 2004).

A maioria das bactérias resistente é portadora de plasmídeos que são, muitas vezes, transferidos entre linhagens. Por esse motivo, o perfil de resistência a antimicrobianos é considerado uma técnica que pode sofrer variações ao longo do tempo e, geralmente, precisa ser combinada com outros métodos de tipificação (OLSEN, J.E. et al. 1993). Um importante veículo de aquisição de genes de resistência a antimicrobianos é via um integron. Os integrons são elementos genéticos móveis encontrados em plasmídeos, em transposons ou integrados no cromossomo bacteriano (YAN, S.S. et al., 2003).

LIMPITAKIS, N. et al. (1999) compararam os resultados de amostras de *Salmonella* isoladas do ambiente de frigoríficos com amostras isoladas de surtos em humanos, praticamente no mesmo período. Constataram que a maioria das linhagens de *S. Typhimurium* isoladas do ambiente de frigoríficos e dos casos de surtos em humanos apresentavam o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos e, ainda, encontraram diferentes perfis de resistência dentro do mesmo sorovar, indicando a presença de

diferentes clones. Estes resultados sugerem a possibilidade de transferência de linhagens de *Salmonella* entre animais e humanos.

A resistência a antimicrobianos vem aumentando intensamente em isolados de *Salmonella* Typhimurium, não sendo observado a mesma tendência entre isolados de *Salmonella* Enteritidis. Este fenômeno tem sido associado à propagação de linhagens epidêmicas multiresistentes de *S. Typhimurium* fagotipo DT 104 (RIVERA, M.J. et al., 1991; YANG, S.J. et al., 2002).

A *S. Typhimurium* DT 104 é reconhecida como um importante patógeno emergente (NIELSEN, B. et al., 1999) possuindo um gene cromossomal codificando para a pentaresistência: ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina (ACSSUT) (THRELFALL, E.J. et al., 1994). Em vários países, este tem sido implicado em muitos casos de infecções em animais e humanos. Este perfil multiresistente vem representando um novo obstáculo no tratamento de infecções por *Salmonella* (THRELFALL, E.J. et al., 1994; POPPE, C. et al., 1998; DALY, M.; FANNING, S., 2000). A presença de *S. Typhimurium* DT 104 em animais é de importância crítica devido à transmissão desse patógeno para produtos de consumo humano derivados desses animais (YANG, S.J. et al., 2002).

De 22 isolados de *S. Typhimurium* multiresistentes, identificados por YANG, S.J. et al. (2002), somente dois foram do fagotipo DT104, indicando que *S. Typhimurium* DT 104 não é a única linhagem multiresistente em *S. Typhimurium*.

Por outro lado, LAILLER, R. et al. (2002) encontraram duas linhagens de *S. Typhimurium* fagotipo DT104 sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Este fato pode ter ocorrido devido a uma deleção no DNA genômico que resultou na perda da pentaresistência.

CASTAGNA, S.M.F. et al (2001) verificaram, em amostras isoladas de suínos, que o sorovar Typhimurium foi o mais resistente em comparação aos demais isolados e constataram que 70% dos isolados de *S. Typhimurium* apresentaram resistência a quatro ou mais antimicrobianos.

Portanto a detecção e o monitoramento de *Salmonella* multiresistentes é importante para escolha adequada de antimicrobianos para o tratamento da salmonelose clínica e para avaliar o risco de propagação dessas linhagens (YANG, S.J. et al., 2002).

#### 2.4.2 MÉTODOS GENOTÍPICOS

O genótipo é a composição genética que codifica todas as características particulares do organismo. Através disso, a biologia molecular trouxe alternativas aos métodos fenotípicos (TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; SASE, C.L. et al., 2005).

A detecção e a manipulação de ácidos nucleicos (DNA e RNA) permitem que genes microbianos sejam examinados diretamente, através de métodos genotípicos. Em geral, os métodos moleculares baseiam-se em técnicas de hibridização, amplificação de determinados genes, clivagem enzimática e seqüenciamento de bases (FORBES, S.D.F.; WEISSFELD, A.S., 1999).

Os métodos de hibridização são baseados numa sonda originada de um organismo conhecido aplicada a uma seqüência desconhecida, que será identificado. Esta sonda necessita ser complementar à seqüência de ácido nucleico e pode ser marcada radioativamente (ex.,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{125}\text{I}$  ou  $^{35}\text{S}$ ), ou não- radiotivamente (biotina ou a digoxigenina). As técnicas de RFLP e detecção de seqüências IS200 são exemplos de técnicas que utilizam esta metodologia (FORBES, S.D.F.; WEISSFELD, A.S., 1999).

O método de amplificação, Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), combina os princípios da complementariedade da hibridização com aqueles de replicação de ácidos nucleicos que são aplicadas repetidamente através de numerosos ciclos. Os genes a serem amplificados podem conter uma informação genética específica (ex. gene *invA* de *Salmonella* sp.) ou serem genes não-codificantes como as seqüências repetitivas de DNA, detectadas pela rep-PCR (BURR, M.D. et al., 1998).

Outros métodos utilizados independentes ou em conjunto com a hibridização ou com o processo de amplificação é o seqüenciamento e a clivagem enzimática dos ácidos nucleicos. Estes podem dar informações para identificar e caracterizar os microrganismos. O seqüenciamento dos ácidos nucleicos determina a exata seqüência de nucleotídeos de um gene ou fragmento de um gene obtido de um organismo (FORBES, S.D.F.; WEISSFELD, A.S., 1999).

A clivagem enzimática do DNA é realizada utilizando enzimas conhecidas como endonucleases ou enzimas de restrição. Cada endonuclease reconhece uma seqüência específica de nucleotídeos (geralmente 4 a 8 nucleotídeos de comprimento). Uma vez reconhecido o sítio, a enzima catalisa a clivagem da fita de ácido nucleico, causando quebra

ou corte na mesma. O número e o tamanho dos fragmentos produzidos depende do tamanho do ácido nucléico e do tipo de enzima utilizada. Um exemplo deste método é a técnica da eletroforese em campo pulsado – PFGE (BURR, M.D. et al., 1998; FORBES, S.D.F.; WEISSFELD, A.S., 1999).

#### *a. Seqüência de Inserção - IS200*

A seqüência de inserção IS200 é um dos menores transposons encontrados (aproximadamente 708bp), altamente conservados, freqüente no gênero *Salmonella* (GILBERT, I.; BARBÉ, J.; CASADESÚS, J., 1990; BEUZÓN et al., 2004) e extremamente comum em *S. Typhimurium* (MILLEMANN, Y. et al., 2000). Este elemento foi primeiramente encontrado em *S. Typhimurium* linhagem LT2 (LAM, S.; ROTH, J.R., 1983) e subseqüentemente mostrou estar presente na maioria dos sorovares de *Salmonella* e em outros gêneros bacterianos como *Shigella*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Clostridium*, *Actinobacillus* e *Helicobacter* (BEUZÓN, C.R.; CHESSA, D.; CASADESÚS, J., 2004; GILBERT, I.; BARBÉ, J.; CASADESÚS, J., 1990). Na *Salmonella enterica*, o IS200 tem sido muito utilizado para discriminação de linhagens (BEUZÓN, C.R.; CHESSA, D.; CASADESÚS, J., 2004).

O número de cópias do IS200 na *Salmonella* sp. pode variar de um a 25 (GILBERT, I.; BARBÉ, J.; CASADESÚS, J., 1990). RUBINO, S. et al. (1998) encontraram em isolados clínicos de *Salmonella* Typhimurium de quatro a 10 cópias do elemento IS200.

Vários estudos apontaram esta técnica como uma ferramenta adequada para estudos epidemiológicos, principalmente quando existir um número elevado de cópias (GILBERT, I.; BARBÉ, J.; CASADESÚS, J., 1990; RUBINO, S. et al., 1998; MILLEMANN, Y. et al., 2000; BEUZÓN, C.R.; CHESSA, D.; CASADESÚS, J., 2004). SHIAFFIANO, A. et al., (1996) demonstraram que a técnica de IS200 foi capaz de discriminar linhagens de *S. Abortusovis* de diferentes origens geográficas, no entanto mostrou um certo grau de relação entre linhagens da mesma área.

A sua ampla distribuição, elevado número de cópias e a sua baixa razão de transposição, torna o IS200 um adequado marcador para estudos epidemiológicos e ecológicos (BEUZÓN, C.R.; CHESSA, D.; CASADESÚS, J., 2004). Por não estarem

presentes em plasmídeos estes elementos podem traçar diferenças cromossômicas entre linhagens de *Salmonella* (BEUZÓN, C.R.; CASADESUS, J., 1997).

Muitas vezes o perfil de hibridização com IS200 foi combinado com outras técnicas para discriminar entre sorovares de *Salmonella* ou linhagens, sendo essa combinação a mais indicada para a tipificação. Sondas a partir de IS200, para a tipificação de linhagens de *Salmonella* sp., têm sido usadas para a hibridização após a clivagem do genoma com enzimas de restrição e separação dos fragmentos por eletroforese (STANLEY, J.; BAQUAR, N.; THRELFALL, J., 1993; LIEBISH, B.; SCHWAZ, S., 1996; OLSEN, J.E. et al., 1997; UZZAU, S.; HOVI, M.; STOCKER, B.A.D., 1999; MILLEMANN, Y. et al., 2000; BEUZÓN, C.R.; CHESSA, D.; CASADESÚS, J., 2004).

Várias enzimas têm sido utilizadas para a clivagem, no entanto, a enzima *Pst*I fornece uma resolução mais clara dos fragmentos hibridizados (STANLEY, J.; BAQUAR, N.; THRELFALL, J., 1993).

*b. Amplificação de seqüências repetitivas de DNA pela técnica da Reação em cadeia da Polimerase (rep-PCR).*

As seqüências repetitivas de DNA (*rep*) incluem as seqüências REP (*repetitive extragenic palindrome*), ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*) e BOX (Versalovic, J. et al., 1994). Essas seqüências não são codificantes e sua função não é clara, mas alguma importância na organização do genoma bacteriano tem sido sugerido (VERSALOVIC, J. et al., 1994; BURR, M.D. et al., 1998).

A seqüência REP consiste de 38 pares de bases (pb) e pode formar uma estrutura de alça estável (*stem-loop*), estando dispersas em todo o genoma bacteriano (HUNTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M., 1991; VERSALOVIC, J. et al., 1994). A seqüência ERIC possui 126 pb, são altamente conservadas e sua localização no genoma difere entre espécies. Não possui seqüência similar ao REP, no entanto, algumas características dessas seqüências são comuns e podem ser mantidas no genoma bacteriano pelos mesmos mecanismos (HUNTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M., 1991; MARTIN, B. et al., 1992). As seqüências REP e ERIC foram reconhecidas, inicialmente, em bactérias entéricas, incluindo *Salmonella* e *E. coli* (VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; PUPSKI, J.R., 1991; HUNTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M., 1991), sendo

altamente conservados nesses gêneros bacterianos (VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; PUPSKI, J.R., 1991).

Um fragmento específico de DNA poderá ser amplificado mais do que  $10^6$  vezes usando a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A especificidade do fragmento amplificado depende da especificidade do oligonucleotídeo usado como iniciador (“primer”), da DNA polimerase e da temperatura usada para o anelamento desses iniciadores. Essa reação produzirá fragmentos que poderão ser observados em gel de agarose, permitindo a comparação de amostras (OLSEN, J.E.1993).

O método de rep-PCR amplifica um alvo genético conhecido, o qual é designado por elementos repetitivos. Quando dois elementos repetitivos estão localizados próximos entre si, a região que fica entre os mesmos será amplificada (VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; PUPSKI, J.R., 1991). A variabilidade dos sítios de inserção das seqüências repetitivas pode levar a diferenças no tamanho do fragmento que são amplificados resultando em polimorfismo nos padrões de bandas, característico de cada linhagem de bactéria (WEIGEL, R.M. et al.,2001).

As técnicas REP e ERIC-PCR podem ser realizadas com um único oligonucleotídeo iniciador, com um par de oligonucleotídeos iniciadores ou por múltiplos iniciadores. A aplicação de ambas as técnicas aumenta o poder discriminatório em comparação com uma das técnicas utilizada isoladamente (OLIVE, D.M.; BEAN, P.,1999).

Esta técnica vem sendo amplamente utilizada junto com a eletroforese em campo pulsado (PFGE) para a tipificação de microrganismos (VERSALOVIC, J. et al., 1994). A maior vantagem das técnicas baseadas em PCR é que são técnicas simples, com ampla disponibilidade de equipamentos e reagentes, além de serem, provavelmente, mais rápidas.

O método *rep*-PCR vem sendo utilizado com sucesso em estudos epidemiológicos envolvendo *Salmonella* isolada de suínos. WEIGEL, R.M. et al. (2001) concluíram que a técnica de REP-PCR foi muito eficaz na diferenciação de algumas linhagens de *Salmonella* isoladas em granjas de suínos, sendo considerada como uma alternativa a técnica de PFGE. SWANENBURG, M.; KEUZENKEMP, D.A.; SNIJDERS,



J.M.A. (1998) demonstraram que o ERIC-PCR foi eficiente para a tipificação de *Salmonella*. isoladas de suínos.

*c- Eletroforese em campo pulsado - PFGE (pulsed-field gel eletroforesis)*

O princípio da eletroforese em campo pulsado (PFGE) é a utilização de uma técnica especial de eletroforese para separar fragmentos cromossômicos grandes gerados pela clivagem do DNA cromossômico com enzimas de restrição de corte raro (SALYERS, A.A.; WHITT, D.D., 1994). Estas enzimas de restrição geram um limitado número (10 a 20) de fragmentos de alto peso molecular que não podem ser resolvidas pela eletroforese convencional. Os padrões resultantes são altamente específicos para linhagens de uma variedade de organismos. Esta técnica tem sido considerada “padrão ouro” de tipificação molecular por ter um elevado poder de diferenciação (OLIVE, D.M.; BEAN, P., 1999). Por este motivo, tem grande valor epidemiológico na diferenciação de linhagens patogênicas e no monitoramento de sua propagação na população. No entanto, um dos fatores limitantes desta técnica é o tempo, pois a maioria dos protocolos levam de 5 a 6 dias para obtenção de resultado (GAUTON, R., 1997).

A utilização de três diferentes endonucleases de restrição e a comparação dos perfis obtidos aumenta o poder de discriminação desta técnica. LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S., (1996) diferenciaram amostras de *S. Enteritidis* com três endonucleases de restrição (*Xba* I, *Spe* I e *Not* I). No entanto, a enzima de restrição de eleição para a diferenciação de *S. Typhimurium* é a *Xba*I (KARIUKI, S. et al., 2000; HUDSON, C.R. et al., 2001).

A análise pela PFGE tem sido altamente efetiva para estudos epidemiológicos de uma ampla variedade de bactérias, inclusive para a tipificação molecular de *S. Typhimurium*. SANDVANG, D. et al. (2000) demonstraram através da técnica de PFGE que um simples clone de *S. Typhimurium* persistiu em uma granja de suínos por um longo período. TSEN, H.Y.; LIN, J.S.;HSIEN, H.Y., 2002 encontraram uma relação entre as linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de casos esporádicos de salmonelose em humanos e isoladas de animais quando utilizaram a técnica de PFGE e perfil de resistência a antimicrobianos. A PFGE em um estudo realizado por LAILLER, R. et al. (2002)

demonstrou ser uma ferramenta útil para discriminar e rastrear linhagens de *S. Typhimurium* de diferentes origens.

Através de associadas técnicas de tipificação (PFGE, perfil de resistência a antimicrobianos e fagotipificação) foi possível verificar que suínos infectados e o ambiente de abate eram os determinantes na contaminação das carcaças (BOTTELDOORN, N. et al., 2004).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABO, S.; BROWN, D. J.; OLSEN J. E. Virulence characterization of a strain of *Salmonella enterica* subspecies *houten* (subspecies IV) chromosomal integrated *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes. **Research Microbiol**, v.151, p.183-189, 2000.

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, 2000.

ANDERSON, E.S.; GALBRAITH N.S.; TAYLOR, C.E.D. An outbreak of human infection due to *Salmonella* Typhimurium phage-type 20a associated with infection in calves. **The Lancet**, v.22, p.854-858, 1961.

ANDERSON, E.S. et al. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. **Journal Hygiene**, London, v. 78, 297-300, 1977.

ANDERSON, E.S.; WARD, L.R.; SAXE, J. Correlation of phage type, biotype and source in strains of *Salmonella typhimurium*. **Journal Hygiene**, v.81, p.203-217, 1978.

ANG-KÜÇÜKER, M. et al. Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains isolated in Istanbul, Turkey. **Clinical Microbiology Infection**, v. 6, 593-599, 2000.

BANDEIRA, R M. **Presença de *Salmonella* sp. em suínos ao abate e em cortes de pernil processados em frigoríficos do Rio Grande do Sul**. 2003. 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

BARRY, A.L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility Test: Diffusion Test Procedure. In: LENNETTE, E.H. et al. **Manual of clinical microbiology**. 4<sup>th</sup> ed. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1985. p.978-987.

BAUDART J. et al. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.4, p.1544-1552, 2000.

BEAUDIN, B. A. et al. Susceptibility of human isolates of *Salmonella* Typhimurium DT104 to antimicrobial agents used in human and veterinary medicine. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.42, p.17-20, 2002.

BESSA, M.C., COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal Veterinary Research** 24, 80-84, 2004.

BEUZÓN, R. CASADESÚS, J. Conserved structure of IS200 in *Salmonella*. **Nucleic Acids Research**, v. 25,n. 7, p.1355-1361, 1997.

BEUZÓN, C. R.; CHESSA, D.; CASADESÚS, J. IS200: an old and still bacterial transposon. **International Microbiology**, v. 7, p.3-12, 2004.

BLAHA, T. The impact of *Salmonella* on the swine industry. In: SWINE CONFERENCE, 1996, Nebraska. **Proceedings...**Nebraska: School University of the Nebraska, 1996, p. 1-20.

BLAHA, T. The state of the art of salmonella. In: THE ALLEN D. LEMAN SWINE CONFERENCE, 1997, Minnesota. **Proceedings...** Minnesota: [s.n.], 1997, p.79-81.

BORREGO, J. et al.. Comparison of epidemiology markers of *Salmonella* strains isolated from different sources in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.3058-3064, 1992.

BOTTELDOORN, N. et al. M. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. **Applied and Environmental microbiology**, v.70, n.9, p.5305-5314, 2004.

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

BURR, M. D.; JOSEPHSON, K. L; PEPPER, I. L. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v.27,p.24-30, 1998.

CALLOW, B.R. A new phage-typing scheme for *SalmonellaTyphi-murium*.**Journal Hygiene**, v.57, p.346-359, 1959.

CALZADA, C.T. et al. Sorotipos de *Salmonella* identificados no período 1977-1982, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.44,n.1, p.1-18, 1984.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R. *et al.* (Eds.) **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999, p.229-238.

CARLSON, A.R.; BLAHA,T. On-farm *Salmonella*-control procedures-what is known? In: INVESTIGATIONS INTO ZOONOTIC *SALMONELLA* IN MINNESOTA, 2, Washington, 1998. **Proceedings**. Washington: [s.n.], 1998. p.141-147.

CASTAGNA, S.M.F. et al. Antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* sp. isolated from slaughtered pigs in the state of Rio Grande do Sul- Brazil. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* AND

OTHER FOOD BORNE PATHOGENS IN PORK: SALINPORK, 4, Leipzig, **Proceedings...**, 2001, 412-414.

CASTAGNA, S.M.F. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scient Veterinariae**, v.32, 141-147, 2004.

CAUDURO, P.F.; MEZZANI. A.; DIAS, C.A.G. Isolamento de *Salmonella* Tennessee em fezes humanas no Rio Grande do Sul. **Revista Microbiologia**, São Paulo, v.17, n.2, p.113-159, 1986.

CHMIELEWSKI, R.; WIELICZKO, A.; KUCZKOWSKI, M.; MAZURKIEWICZ, M.; UGORSKI, M. Comparison of ITS profiling, REP- and ERICPCR of *Salmonella* Enteritidis isoaltes from Poland. **Journal Veterinary Medical**, v.49, p.163-168, 2002.

CLARKE, R.C.; GYLES, C.L. *Salmonella*. In: GYLES, C.L.; CHARLES, O.T. **Pathology Bacterial Infection Animal**. 2. ed. Ames: Iowa State University, p.133-153, 1993.

CÔRTEZ, J. A. **Epidemiologia: Conceitos e princípios fundamentais**. São Paulo: Livraria Varela, 1993. p.167.

CZAMANSKI, R. T. Avaliação da atividade antibacteriana de filtrados de quefir artesanal. **Acta Scientiae Veterinarie**, v.31, n.2, p. 143-144, 2003.

DALY M., FANNING S. Characterization and Chromosomal Mapping of Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.11, p.4842-4848, 2000.

DAVIES, P.R. et al. Isolation of *Salmonella* serotypes from feces of pigs raised in a multiple-site production system. **Journal American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.212, n.12, p.1925-1929, 1998.

DAVIS, M.A.; HANCOCK, D.D.; BESSER T.E. Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: the importance of dissemination. **Journal Lab. Clinical Medical**, v.140, n.3, p.135-141, 2002.

DIAS, R.S.; CARMO, L.S.; SILVA, M.C.C. Surto de toxinfecção alimentar causado pela ação simultânea de enterotoxina estafilocócica e *Salmonella* Enteritidis. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.58, n.1, p.7-11, 1999.

DUGUID, J.P. et al. A new biotyping scheme for *Salmonella typhimurium* and its phylogenetic significance. **Journal Medical Microbiology**, v.8, p.149-166, 1975.

EKPERIGIN, H.E.; NAGARAJA, K.V. *Salmonella*. **The Veterinary Clinical North America**, Philadelphia, v.28, n.2, p.17-29, 1998.

- ESPER, M.R.N.R. et al. *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.57 n.2, p. 45-50, 1998.
- FEDORKA-CRAY, P.J. et al. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Results for Swine. 1999 In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., **Proceeding**. Washington: Adix, 1999. p.248-249.
- FELIX, A.; CALLOW, B.R. Typing of paratyphoid B bacilli by means of Vi bacteriophage. **British Medical Journal**, ii, p.127, 1943.
- FIERER, J.; GUINEY D. G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. **The journal of Clinical Investigation**, v.107,n.7, p.775-780, 2001.
- FINLAY, B.B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiology Review**, Washington, v.53, n.2, p.210-230, 1989.
- FORBES, S. D.F.; WEISSFELD, A.S. **Diagnostic Microbiology**. 10<sup>nd</sup> ed. London: Mosby's, 1999. p.188-207.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. 181p.
- GAUTOM, R. Rapid pulsed-field electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, n.11, p.2977-2980, 1997.
- GEBREYES, W. A. et al. Characterization of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. **Journal of Food Protection**, v.67, n.4, p.698-705, 2004.
- GEIMBA, M.P. et al. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal Food Protection** v.67, p.1229-1233, 2004.
- GIBSON, E.A. *Salmonella* infection in pigs. **The British Veterinary Journal**, London, v.125, n.9, p.431-436, 1969.
- GILBERT, I.; BARBÉ, J.; CASADESÚS, J. Distribution of insertion sequence. **Journal of General microbiology**, v.136, p.2555-2560, 1990.

GRAY, J.T.; STABEL, T.J.; FEDORKA-CRAY, P.J. Effect of dose on the immune response and persistence of *Salmonella* Choleraesuis infection in swine. **America Journal Veterinay Research.**, Chicago, v.57, n.3, p.313-319, 1996.

GUDMUNDSDOTTIR, S.; HARDARDOTTIR, H.; GUNNARSSON, E. Subtyping of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium outbreak strains isolated from human and animals in Iceland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.23,n.10, p.4833-4835, 2003.

GULIG, P.A. et al. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. **Molecular Microbiology**, v.7,n.6, p.825-830, 1993.

HILTON, A.C.; BANKS, J.G.; PENN, C.W. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.575-584, 1996.

HIRSH, D.C. *Salmonella*. In: BIBERSTEIN, D.V.M.; ZEE, Y.C. **Review of veterinary Microbiology**. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1990. p. 110-115.

HOLT, J.G. et al.. Facultative anaerobic Gram-negative rods. In: BERGEY'S manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.186-187.

HUDSON, C.R. et al. Determination of close genetic relatedness of the major *Salmonella enteritidis* phage types by pulsed-field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several *Salmonella* virulence genes. **Avian Diseases**, v.45, p.875-886, 2001.

HUNTON, C.S.J.; HIGGINS, C.F.; SHARP, P.M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5,n.4, p.825-834, 1991.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994-1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz.**, São Paulo, v.58,n.1, p.47-51, 1999.

JOHNSON, J. R. et al. Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39,n.10,p.3452-3460, 2001.

JUBB, K.V.F. et al. The alimentary system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. **Pathology of domestic animals**. 3.ed. Orlando: Academic Press, 1985. v.3, p.135-137.

KARIUKI S. et al. A. Genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotypes typhimurium from two regions of Kenya. **Immunology and Medical Microbiology**, v.29,p.9-13, 2000.

- KHAN, A. A. et al. Detection of multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium* DT104 multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Microbiology Letters**, v.182,n.2, p.355-360, 2000.
- KICH, J.D. et al. Evaluation of the antibacterial activity of six commercial disinfectants against *Salmonella Typhimurium* strains isolated from swine. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 1, p. 33-39, 2004.
- LACONCHA, I. et al. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v.40, p.27-34, 1998.
- LAILLER, R. et al. Subtyping of *Salmonella Typhimurium* by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. *Pathol. Biol.*, v.50, p.361-368, 2002.
- LAM, S; ROTH, J.R. IS200: a *Salmonella*-specific insertion sequence. **Cell**, v.34,n.3, p.951-960, 1983.
- LANDERAS, E. et al. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34,n.9, p.2294-2296, Sept., 1996.
- LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J.A.; FALCÃO, D.P. Surto de toxinfecção alimentar por *Salmonella Bredeney*. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.19, p.92-93, 1985.
- LANGLOIS, B. E.; DAWSON, K.A. Antimicrobial resistance of Gram-negative enteric bacteria from pigs in a nonantimicrobial-exposed herd before and after transportation. **Journal of Food Protection**, v.62,n.7, p.797-799, 1999.
- LAX, A.J. et al. Current perspectives in salmonellosis. **British. Veterinary Journal**, London, v.154, n. 4, p.351-337, 1995.
- LESNICK, M.L. et al. The *Salmonella spvB* virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. **Molecular Microbiology**, v.39,n.6, p.1464-1470, 2001.
- LETELLIER, A. MESSIER, S.; QUESSY, S. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62,n.1, p.22-25, 1999.
- LIBBY, S.J. et al. The *spv* genes on the *Salmonella dublin* virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. **Infection and Immunity**, v.65,n.5, p.1786-1792, 1997.



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, 2002.

LIEBISCH, B; SCHWARZ, S. Molecular typing os *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Enteritidis isolates. **Journal Medical Microbiology**, v.44, p.52-59, 1996.

LIMPITAKIS, N. et al. Antibiotic sensitivity profile of *Salmonella* isolated from two slaughterhouses and human clinical cases. 1999 In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., **Proceeding**. Washington: Adix, 1999. p.257.

LING, M. L. et al. An outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Typhimurium,DT104 linked to dried anchovy in Singapore. **Epidemiology Infection**,v.128, p.1-5, 2002.

LINTON, A.H. Salmonellosis in pigs. **British Veterinary Journal**, London, v.135, n. 2, p.109-112, 1979.

MARCUS, S. L.et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v.2, p.145-156, 2000.

MARKOWSKY, G.; GERSHMAN, M.; HUNTER, J. Phage typing sets. **Mathl. Comput. Modelling**, v.16,n.6/7, p.113-119, 1992.

MARTIN, B. H.O. et al. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. **Nucleic Acid Research**, v.20, p.3479-3483, 1992.

MILLEMANN, Y. et al. Value of plasmid profiling ribotyping and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *salmonella enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**,v.33,n.1, p.173-179, Jan.1995.

MILLEMANN, Y. et al. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*.**Immunology and Medical Microbiology**,v.14, p.129-134, 1996.

MILLEMANN, Y. et al. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serotype Typhimurium bovine isolates from farm to meat. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38,n.6, p.2204-2209, June. 2000.

MOO, D. et al. The isolation of *Salmonella* from jejunal and caecal lymph nodes of slaughtered animals. **Australian Veterinary Journal**, v.56, p.181-183, Apr.1980.

MORSE, E.V.; DUNCAN, M.A. Salmonellosis - An environmental health problem. **Journal America Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v.165, n.11, p.1015-1019, 1974.

NIELSEN, B.; MOGELMOSE, V.; SORENSEN.L.L.; NIELSEN,A.C. Tracing back multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 from pork at the slaughterhouse to a specific swine herd by strategical use of serology and culture.1999 1999 In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 3., **Proceeding**. Washington: Adix, 1999. p.261-263.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: A model for bacterial. **Annual Review Medical**, v.52, p.259-274, 2001.

OLD, D.C.; THRELFALL, E.J. *Salmonella*. In: COLLIER, L. (Ed.) **Microbiology and Microbial Infections**. 9<sup>th</sup> ed. London: Topley & wilson, 1998.CD-ROM.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.

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

OLSEN, J.E. et al. Genomic relationships between selected phage types of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serotype Typhimurium defined by ribotyping, IS200 typing and PFGE. **Microbiology**, v.143, p.1471-1479, 1997.

OLSEN, J.E. et al. Differences in the carriage and the ability to utilize the serotype associated virulence plasmid in strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium investigated by use of a self-transferable virulence plasmid, pOG669. **Microbial Pathogenesis**, v.36, p.337-347, 2004.

PASMANS, F.; van IMMERSEEL, F.; HERMANS, K.; HEYNDRIKX, M.; COLLARD, J.M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Assessment of Virulence of pigeon isolates of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium variant Copenhagen for humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42,n.5, p.2000-2002, 2004.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W. Supplement 1999 (n°43) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.151, p.893-896, 2000.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.;BRENNER, F.W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000(n°44) to the Kauffmann-White scheme.**Research Microbiology**,v.152,p.907-909,2001.

- POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2001 (n°45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.154,n.3, p.173-174, 2003.
- POPPE, C. et al. *Salmonella* Typhimurium DT104: A virulent and drug-resistance pathogen. **Canadian Veterinary Journal**, v.39, p.559-565, 1998.
- QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Mosby's, 1994. 648p.
- RABSCH, W. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. **Infection Immunology**, v.70, p.2249-2255, 2002.
- RADEMAKER, J.L.W.; de BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. DNA markers: protocols, applications and overviews. New York: Willy and Sons, 1997. p. 151-171.
- REYNOLDS, I.M.; MINER, P.W.; SMITH, R.E. *Salmonella* Enteritidis from porcine meningitis. A case report. **The Cornell Veterinary**, New York, v.58, n.1, p.180-185, 1968.
- RIVERA, M. J. et al. Molecular and epidemiological study of *Salmonella* clinical isolates. **Journal of clinical Microbiology**, v.29, n.5, p.927-932, may. 991.
- RUBINO, J.R. The economic impact of *Salmonella* infection. **Clinical Microbiology News.**, Amsterdam, v.19, n.4, p.25-32, 1997.
- RUBINO, S. et al. IS200 fingerprint of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium human strains isolated in Sardinia. **Epidemiology Infection**, v. 120, p.215-222, 1998.
- RYCHLIK, I.; BARROW, P.A. *Salmonella* stress management and its relevance to behavior during intestinal colonisation and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, p.1-20, 2005.
- SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. *Salmonella* Infections. In:\_\_\_\_\_. **Bacterial Pathogenesis**. Washington: ASM, 1994. p. 229-243.
- SANDER, A., et al. Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p.2973-2981, 1998.
- SANDVANG, D. B. et al. Persistence of a *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clone in Danish pig production units and farmhouse environment studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Microbiology Letters**, v.187, p.21-25, 2000.
- SCHIAFFINO, A. et. al. Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortusovis*. **Applied Environment Microbiology**, v.62, p.2375-2380, 1996.

SCHMIEGER, H. Molecular survey of the *Salmonella* phege typing system of Anderson. **Journal of Bacteriology**, v.181,n.5, p.1630-1635, 1999.

SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis in swine. **Compendium of Continuing Education**, v. 13, n.1, p. 139-148, 1991.

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L.; TAYLOR, D. J. **Disease Swine**. 8<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa: University Press, 2000. p.535-551.

SCHWARZ, S; LIEBISCH, B. Use of ribotyping, IS200 typing and plasmid analysis for the identification of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Typhimurium vaccine strain zoosaloral H and its differentiation from wild type strains of the same serovar. **Zentralblatt Für Bakteriologie**, p. 295-299, 1994.

SCHWARZ, P. et al. Correlação entre sorologia e isolamento de *Salmonella* em suínos abatidos no Sul do Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 12., **Proceedings**. Fortaleza. 2005. p.80-81.

SILVA, L. et al. Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella* sp. em um sistema integrado de produção de suínos. In: CONGRESSO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003 Goiânia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003, p.61 - 62.

SIVAPALASINGAM, S. et al. multiple outbreak of *Salmonella entérica* serotype Newport infection linked to Mango consumption: impact of water-dip disinfestation technology. **Clinical Infection Diseases**, v.37, p.1585-1590, 2003.

SOBESTIANSKY, J. et al. Salmonelose. In: \_\_\_\_\_(Eds). Clínica e patologia suína. Goiânia: [S.n.], 1999. 464p.

SOJKA, W.J.; GITTER, M. Salmonellosis in pigs with reference to its public health significance. **Veterinary Reviews and Annotations**, v.7, n.1, p.11-28, Apr.1961.

SOTO, S. M. et al. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* SEROVAR Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.35-43, 2001.

STANLEY, J; BAQUAR, N; THRELFALL, J. Genotypes and phylogenetic relationships of *Salmonella typhimurium* are defined by molecular fingerprinting of IS200 and 16s rrn loci. **Journal of general microbiology**, v.139, p.1133-1140, 1993.

SWANENBURG, M; KEUZENKAMP, D.A.; SNIJDERS, J.M.A. Validation of ERIC PCR as a tool in epidemiologic research of *Salmonella* in slaughter pigs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 141-144, 1998.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P; SNIJDERS, J.M.A. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal Food Microbiology**, v.70, p.243–254, 2001.

TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.4,n.5, p.493-499, 2001.

THRELFAL, E J; FROST, J A. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. **Journal of Applied Bacteriology**. v.68, p.5-16, 1990.

THRELFALL, E J. et al. Epidemic in cattle and humans of *Salmonella* Typhimurium DT104 with chromosomally integrated multiple drug resistance. **The Veterinary Record**, v.28, p.577, May.1994.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; SASE, C.L. **Microbiologia**. 8 ed. Local: Art Méd., 2005. 211p.

TSEN,H. Y.; LIN,J.S.; HSIEN,H.Y. Pulsed field gel electrophoresis for animal *Ssalmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.73-80, 2002.

UZZAU, S.; HOVI, M.; STOCKER, B.A.D. application of ribotyping and IS200 fingerprinting to distinguish the five *Salmonella* erotype O6,7:c:1,5 groups: Choleraesuis sensu stricto, Choleraesuis var. Kunzendorf, Choleraesuis var. Decatur, Paratyphi C, and Typhisuis. **Epidemiology Infection**, v.123, p.37-46, 1999.

UZZAU, S. et al. Host-adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology Infection**, v.125, p.229-255, 2000.

WARD, L.R.; AS, J.D.H.; ROWE,B. Aphage typing scheme for *Salmonella enteritidis*. **Epidemiology and infection**, v.99,p.291-294, 1987.

WARD,L.R.; THRELFALL,E.J. The emergence of a new *Salmonella* Typhimurium phage type associated with pigs. In: OF THE 4TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* AND OTHER FOOD BORNE PATHOGENS IN PORK: SALINPORK. **Anais...** Leipzig, Germany, 2001, 174-176.

WEIGEL, R M. et al. Identification of patterns of transmission of *Salmonella* with swine production systems using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and repetitive sequence polymerase chain reaction (REP-PCR): a quantitative analysis. **Food and Agricultural Research**, p.566-573, 2001.

WERBER, D. et al. International outbreak of *Salmonella Oranienburg* due to German chocolate. **BMC Infection Diseases**, 2005. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/5/7/prepub>> Acesso em 24/01/2005.

WILCOCK, B.P. et al. The significance of the serotype in the clinical and pathological features of naturally occurring porcine salmonellosis. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, Indiana, v.40, p.81-88, Jan.1976.

WILCOCK, B.P.; SCHWARTZ, K.J. Salmonellosis. In: LENSAN, A.D.; SHAW, B.E.; MENGELIN L. W. et al. (Eds) **Diseases of swine**. 7. ed. [S.l.: s.n.], 1992. p.570-580.

YAN, S.S. et al. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v.4, p.189-204, 2003.

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,p.295-301, 2002.

Van Asten, J.A.M.; Koninkx, J.F.G.; Van Dijk, J.E. Lettr to the Editor. **Veterinary Microbiology**, v.108,p.149-152,2005.

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, p.251-259, 2005.

VERSALOVIC, J; KOEUTH T; LUPSKI J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19,n.24, p.6823-6831, 1991.

VERSALOVIC, J. et al. Genomic Fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p. 25-40, 1994.

ZEBRAL, A. A.; FREITAS, C. A.; HOFER, E. Ocorrência de *Salmonella* em gânglios linfáticos de suínos aparentemente normais, abatidos no matadouro de Santa Cruz, cidade do Rio de Janeiro, Guanabara. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 3, p.223-235, 1974.

**CAPÍTULO 2: PHENOTYPIC AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION OF *SALMONELLA ENTERICA*  
SUBSP. *ENTERICA* SEROVAR TYPHIMURIUM  
ISOLATED FROM PIGS IN RIO GRANDE DO SUL,  
BRAZIL**

SUBMETIDO: LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY, 2006

**Phenotypic and molecular characterization of**  
***Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio**  
**Grande do Sul, Brazil**

**Marjo Cado Bessa<sup>1</sup>, Geovana Brenner Michael<sup>1</sup>, Nunzia Canu<sup>2</sup>, Cláudio Wageck Canal<sup>1</sup>, Marisa Cardoso<sup>1\*</sup>, Wolfgang Rabsch<sup>3</sup>, and Salvatore Rubino<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Dip. Di Scienze Biomediche, University of Sassari, Italy. <sup>3</sup>Robert Koch Institut, Wernigerode Branch, Germany.

\*Corresponding author: Marisa Cardoso, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, 90540-000. Porto Alegre, RS, Brazil. Tel: +555133166123, Fax: +555133167305.

**E-mail address:** [mcardoso@ufrgs.br](mailto:mcardoso@ufrgs.br).



## ABSTRACT

M.C.BESSA et al. 2006.

**Aims:** Investigate the relatedness of a collection of porcine *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S.*) serovar Typhimurium strains isolated in Southern Brazil.

**Methods and Results:** Sixty-five *S.* Typhimurium strains isolated from healthy pigs slaughtered at three slaughterhouses were submitted to phage typing, IS200 hybridization, antimicrobial susceptibility testing, and PCR assays targeting the *spvR* region. Two strains isolated from porcine and human outbreaks, respectively, were also characterized. DT177 (41/65) was the most frequent phage type identified. Five IS200 patterns (A, B, C, D and E) were detected. Pattern A included 62 strains, whereas patterns B, C and D were represented by unique strains. Outbreak strains were classified in pattern E. The *spvR* region was detected in only five strains. A high level of resistance was found, e.g. to tetracycline, sulfonamide, and streptomycin. Many isolates from animals of farms located in different geographic areas shared the same phenotypic and molecular profile.

**Conclusions:** Results suggested that clonal groups of *S.* Typhimurium are present in Southern Brazil.

**Significance and Impact of the Study:** This is the first report on characterization of *S.* Typhimurium strains isolated from pigs in Brazil. It may contribute to elucidate the epidemiology of *Salmonella* infection in swine herds in this region.

**Key words:** *Salmonella* Typhimurium; pig; phage typing; IS200; antimicrobial resistance.

## INTRODUCTION

A wide range of *Salmonella* serovars have been frequently isolated from asymptomatic pigs (Davies et al. 1997). These carrier animals are the main source of infection to other pigs and contamination to the environment, to slaughter plants and, ultimately, to pork products (Swanenburg et al., 2001).

In previous studies carried out in Rio Grande do Sul State, Brazil, *Salmonella* sp. was isolated from slaughtered pigs and also from pork. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (*S.*) serovar Typhimurium was the most prevalent among the isolated strains (Bessa et al. 2004; Castagna et al. 2004).

The investigation of phenotypic and molecular profiles can provide important information that might be used in the epidemiological characterization of *Salmonella* strains (Olsen et al. 1993). Among the phenotypic methods, phage typing and antimicrobial resistance profile have been used worldwide, often in association with molecular methods (Rubino et al. 1998; Ang-Küçüker et al. 2000; Gudmundsdottir et al. 2003).

IS200 has been used to elucidate outbreaks and to determine evolutionary relatedness among *Salmonella* strains, and was reported as a valuable method for discrimination of *S.* Typhimurium (Olsen et al. 1993; Rubino et al. 1998). On the other hand, IS200 fingerprints must be combined with other typing method to achieve better discrimination (Beuzón et al. 2004).

Most strains of *S.* Typhimurium harbor a serovar-associated virulence plasmid (SAP) which carries the *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes (Gulig et al. 1993). The *spv* operon (*spv*ABCDR) is involved on the ability of the strain to resist to macrophage damage and is considered important for the virulence of *Salmonella* strains (Guilloteau et

al. 1996). Furthermore, the *spvR* gene has been targeted in PCR assays, in order to characterize *Salmonella* strains (Rubino et al. 1998).

The aim of this study was to characterize strains of *S. Typhimurium* isolated from pigs in Southern Brazil, using phage typing, antimicrobial resistance testing, insertion sequence IS200 profiling, and detection of the *spvR* region. To our knowledge, this is the first attempt to type porcine *S. Typhimurium* strains isolated in Brazil.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains**

Sixty-five porcine strains of *S. Typhimurium* isolated between 1999 and 2001 were used in this study. The strains were isolated from submandibular and mesenteric lymph nodes, tonsils and intestinal contents of healthy pigs slaughtered in three abattoirs (designated I, II, and III) located in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The slaughtered animals came from 36 farms located in four different geographic areas of Rio Grande do Sul (Vale, Serra, Missões, and Campanha regions). Among these 65 *S. Typhimurium* strains, 18 were isolated from different samples (mesenteric lymph nodes and intestinal content) collected from nine animals. One strain (no. 2713) from an outbreak of gastroenteritis in a swine farm, and one strain (no. 2714) from cooked beef implicated in a human outbreak were also included in this study. Genomic DNA extraction and hybridization assays were conducted in Instituto di Igiene e Medicina Preventiva, University of Sassari, Italy. Phage typing was performed at the Robert Koch Institut,

Wernigerode Branch, National Reference Center for Salmonellae and other Enterics, Germany.

### **Phage typing and presence of O5 antigen**

Phage typing of *S. Typhimurium* was performed using the extended Anderson system (Anderson et al. 1977). Typing phages were kindly provided by L.R. Linda Ward, Colindale Institute, London. The presence of O5 antigen was determined as previously described (Kauffmann 1934), in order to differentiate between serovar Typhimurium, which possess the O5 antigen and its serological variant Copenhagen (*S. Typhimurium* var. Copenhagen), which lacks such antigen.

### **Antimicrobial susceptibility testing**

The disk diffusion method using Mueller-Hinton agar (Merck, Darmstadt) was conducted according to the document M31-A2 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS 2002) to test the susceptibility of the isolates to the following antimicrobial agents: amikacin (Am, 30 µg), ampicillin (Ap, 10 µg), cefaclor (Ce, 30 µg), ciprofloxacin (Ci, 5 µg), chloramphenicol (Cm, 30 µg), gentamicin (Ge, 10 µg), nalidixic acid (Na, 30 µg), neomycin (Ne, 30 µg), tetracycline (Te, 30 µg), tobramycin (To, 10 µg), streptomycin (Sm, 10 µg), sulfamethoxazole-trimethoprim (St, 25 µg) and sulfonamide (Su, 300 µg).

### **Southern blot and hybridization with IS200 probe**

Genomic DNA preparations were obtained according to Ausubel et al. (1987) using overnight cultures in LB broth.

The DNA was digested overnight with the restriction enzyme *Pst*I (Promega, Madison, USA) was subjected to electrophoresis in 0.8 % agarose gels at 100 V for 1 h.

The IS200 probe was prepared, non-radioactively labeled using the Random prime labeling module kit (Amersham, Little Chalfont, United Kingdom) and detected by CDP-Star<sup>TM</sup> detection module kit (Amersham, Little Chalfont, United Kingdom) as previously described (Schiaffino et al. 1996). Southern hybridization was carried out under high stringency conditions as described by Schiaffino et al. (1996). *S. Abortusovis* SS44 was used as a control in the hybridization studies.

### **PCR for *spv* region**

PCR was performed as described by Rubino et al. (1998), using oligonucleotide sequences corresponding to the *spvR* gene of the *S. Typhimurium* virulence plasmid (5'-CCCCGGGAATTCGC-TGCATAAGGTCAGAAGG-3' and 5'-CCCCGGGATCCATGGATTTCTTG ATTAATAAA-3'). PCR was performed in a 25 µl reaction volume containing 2.5 µl of heat-denatured bacterial DNA solution (20 ng), 25 pmol of each primer, the four deoxynucleotide triphosphates at final concentration of 0.5mM and 0.2 Units of *Taq* DNA polymerase (Promega) in a reaction buffer consisting of 50 mM Tris-HCl pH 8.5, 20 mM KCl and 15 mM MgCl<sub>2</sub>. After 5 min of preheating at 94°C thermocycling was performed on samples for 30 cycles of denaturation (94°C, 1 min), annealing (1 min, 45°C), and elongation (2 min, 72°C). Amplification products were separated by horizontal electrophoresis in 1 % agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light. *Salmonella* Abortusovis SS44 (Schiaffino et al. 1996) was used as *spvR* positive control. A no template control was included to monitor contamination.

### **Data analysis**

The pattern produced by IS200 fingerprinting was evaluated with the commercial Image Master Software (Pharmacia). Dendrogram was constructed by unweighted UPGMA (pair-group method for arithmetic averages), using the Dice coefficient (Sneath and Sokal, 1973) of NTSYS.

### **RESULTS**

Definitive phage type 177 (DT177) was the most prevalent (41 of 65 strains) among the strains of *S. Typhimurium* isolated from pigs in the State of Rio Grande do Sul. Most strains (31/32) isolated from slaughterhouse I were DT177 (Table 1). In contrast, DT 177 was identified in only three and seven strains isolated in slaughterhouses II and III, respectively (Tables 2 and 3). Seven strains reacted with typing phages, but did not conform with any definitive phage types and were classified as RDNC (Table 3). Four different RDNC patterns (1, 2, 3, and 4) were detected among these strains. In slaughterhouse II, DT194 was the most prevalent phage type, while RDNC (1) predominated in slaughterhouse III. The porcine outbreak strain (no. 2713) showed a lytic phage pattern designated as RDNC (3). The strain (no. 2714) isolated from the food poisoning outbreak belonged to DT193. Twenty-six strains from slaughtered pigs of all three slaughterhouses and the strain isolated from the human outbreak did not present the O5 antigen, and were classified as *S. Typhimurium* var. Copenhagen. This variant predominated among strains of DT194 and RDNC (1 and 2).

Insertions of IS200 were seen in all strains and were located on PstI fragments of sizes ranging from approximately 1.8 kb to 23.0 kb (Figure 1a). Sixty-two strains isolated from healthy pigs showed the same pattern (A) with nine copies of IS200. Three strains isolated from mesenteric lymph nodes (no. 2329, 2341, and 2365) revealed different patterns (B, C and D, respectively). The two strains isolated from outbreaks (no. 2713 and 2714) showed another pattern (E), with 6 copies of IS200.

Pattern A showed a similarity ranging from 47 to 60 % to patterns B, C and D. Patterns D and E were related (75% similarity) and formed a group more distant to patterns A, B, and C (Figure 1b).

The *spvR* region was detected in only one strain (no. 2651) of pattern A and in strains that belonged to patterns B, D, and E.

Among the *S. Typhimurium* isolates from slaughtered pigs in Rio Grande do Sul, only one (no. 2339) was susceptible to all antimicrobials tested. The porcine strains showed resistance to tetracycline (90.7 %), sulfonamide (84.6 %), streptomycin (66.1 %), chloramphenicol (43.1 %), nalidixic acid (41.5 %), sulfamethoxazole-trimethoprim (40.0 %), ampicillin (38.5 %), neomycin (15.4 %), tobramycin (9.2 %), amikacin (3.1 %) and cefaclor (1.5 %). All isolates were susceptible to ciprofloxacin.

In slaughterhouse I the multi-resistance level was higher, with most strains resistant to tetracycline, sulfonamide, streptomycin, ampicillin and chloramphenicol (Table 1). On the other hand, most isolates from abattoirs II and III showed resistance to only two drugs. The porcine outbreak strain (no. 2713) was resistant to chloramphenicol, sulfonamide and tetracycline, while the human outbreak strains (2714) was susceptible to all antimicrobials tested.

Many isolates presented a common phage type and antimicrobial resistance pattern. These similar strains were isolated from pigs raised in a same farm, as well as from animals belonging to farms located in different geographic areas.

## **DISCUSSION**

*S. Typhimurium* is one of the most prevalent serovars in pigs and pork in many countries (Swanenburg et al. 2001). However, in this study no porcine *S. Typhimurium* strain isolated in Southern Brazil was the definitive phage type (DT104), which is widely distributed in Europe and North America (Helms et al. 2005). In slaughterhouse I, only DT177 was detected, although the *Salmonella* strains were isolated within a five-month period from pigs belonging to farms located in different geographic areas. *S. Typhimurium* phage type patterns in slaughterhouses II and III were quite different, predominating *S. Typhimurium* var. Copenhagen DT194 and RDNC strains, respectively. The identification of *S. Typhimurium* var. Copenhagen among porcine isolates was formerly reported, mostly among those belonging to DT104 (Gebreyes and Altier 2002). A possible reason for this conserved phage type pattern observed within slaughterhouses over time is features of the pork production chain in Brazil, in which finishing farms are engaged in vertically integrated systems with large companies. This management system provides genetics, feed and technical services, furnishing common points to the *Salmonella* transmission chain on farm and at slaughter.

Phage type DT177 has been scarcely reported in the literature. However, a large outbreak of human salmonellosis in Germany caused by the consumption of pork sausages



contaminated by this phage type (Sauer et al. 2001) demonstrated the importance of *S. Typhimurium* DT177 as a foodborne pathogen.

Most of the *S. Typhimurium* strains isolated from healthy slaughtered pigs showed a highly conserved IS200 hybridization pattern. IS200 patterns were the same even among strains isolated between 1999 and 2001 from pigs of different geographic regions. Although IS200, associated to phage typing, antimicrobial resistance testing and plasmid profiling, could discriminate among human *S. Typhimurium* isolates in Northern Sardinien (Rubino et al. 1998), a lower level of polymorphism in *S. Typhimurium* strains isolated in a same geographic area was also reported (Millemann et al. 1995).

In the present study, the diversity of IS200 pattern could be found only in strains belonging to unique phage types (pattern B-DT99; pattern C-DT8; pattern D-DT18; pattern E-DT193 and –RDNC3), indicating that these five strains, including the outbreaks strains, might be evolutionarily distinct from porcine strains isolated in the same region. In fact, the pattern B strain (no.2329, Table 3) belonged to a phage type (DT99) rarely found in sources other than pigeons (Rabsch et al. 2002) and may have been transmitted to pigs raised in farms where these animals circulate.

The difference found in IS200 pattern was correlated with *spvR* detection results. While only one porcine strain (no. 2342) of pattern A presented the *spvR* gene, strains of patterns B and D were positive to this gene. On the other hand, both strains isolated from outbreaks (pattern E) were *spvR* positive. Similar results have been reported by Geimba et al. (2004), who detected the *spvR* gene in 82.6 % of *Salmonella* strains isolated from food associated with outbreaks in the State of Rio Grande do Sul.

Antimicrobial resistance of *Salmonella* strains represents an increasing concern worldwide. In the present study, most porcine strains showed a resistance pattern that included at least tetracycline, streptomycin or sulfonamide. The resistance to these antimicrobials seems to be widespread, probably associated with their use in high quantities for extended time periods for prophylactic, metaphylactic and therapeutic applications in farm animals (Wegener 2003).

A marked concentration of multi-resistant strains was detected in slaughterhouse I. The link between antimicrobial use and resistance might explain the differences in resistance patterns found among porcine strains in this study. While isolates from the same geographic region and phage type showed a marked difference on the resistance pattern, strains originating from the same slaughterhouse presented a conserved profile. This may have been caused by a common prophylactic regimen used in the herds that were integrated with the contractors. The protocols adopted by the companies show variations concerning amount and type of the antimicrobial used and can result in the selection and widespread of multiresistant strains.

Phage types in combination with the antimicrobial resistance pattern proved to be a useful tool as epidemiological marker to trace back infection sources (Rabsch et al. 2001). We found strains with a common phage type and multi-resistant pattern in the three slaughterhouses. These strains were often isolated from animals of different farms, but slaughtered on the same day. Considering that a lairage period of at least six hours was adopted in the slaughterhouses analyzed herein, the infection of pigs could have occurred in this period, as previously reported in other studies (Hurd et al 2001). In contrast, seven strains from slaughterhouse I with a common resistance pattern (Ap Cm Na Sm St Su Te)

were isolated from animals slaughtered on different days and originated from different farms. In this way, common strains might be also circulating in this integration system.

In conclusion, results of typing methods associated to the origin diversity of the strains suggest that clonal groups of *S. Typhimurium* are circulating in swine herds engaged in vertically pork production system in Southern Brazil.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This study was supported by grants from the Regione Autonoma della Sardegna, CAPES and CNPq (Brazil)

TABLE 1. Antimicrobial resistance profile, phage type, presence of O5 antigen and IS200 pattern of *S. Typhimurium* strains isolated between 1999 and 2000 in slaughterhouse I.

Strain	Farm location	Isolation date	Farm number	Source *	Antimicrobial resistance <sup>†</sup>	Phage type	O5 antigen	IS200 pattern	
2322	Missões	11/99	1	ML <sup>a</sup>	Ap Cm St Su	177	∅	A	
2323			1	F <sup>a</sup>	Cm Sm St Su	177	∅	A	
2342			1	ML	Ap Sm Su Te	Ut	+	A	
2343			1	F	Am Ap Cf Cm Gm Na Ne Sm St Su Te To	177	∅	A	
2328		05/00	13	ML <sup>d</sup>	Am Cm Su Te	177	∅	A	
2329			13	F <sup>d</sup>	Cm Ne St Su Te	177	∅	A	
2374			16	ML	Cm Ne Sm St Su Te	177	∅	A	
2361			16	F	Cm St Su Te	177	∅	A	
2344	Vale	11/99	2	F	Ap Cm Na Sm St Su Te	177	+	A	
2345			2	F	Ap Cm Na Sm St Su Te	177	+	A	
2346			2	F	Ap Cm Na Sm Su Te	177	+	A	
2347			3	F	Ap Sm Te To	177	+	A	
2348			3	ML	Ap Cm St Su Te To	177	+	A	
2324			01/00	4	ML <sup>b</sup>	Ap Cm Na Sm St Su Te	177	+	A
2325		4		F <sup>b</sup>	Ap Cm Na Sm St Su Te	177	+	A	
2350		5		F	Ap Cm Na Sm St Su Te	177	+	A	
2349		6		F	Ap Cm Na Sm Su Te	177	+	A	
2326		03/00		7	ML <sup>c</sup>	Ap Na Sm Su Te	177	+	A
2327				7	F <sup>c</sup>	Ap Na Sm Su Te	177	+	A
2352			8	F	Ap Na Sm Su Te	177	+	A	
2354	8		F	Ap Na Sm Su Te	177	+	A		
2353	9		ML	Ap Na Sm Su Te	177	+	A		
2356	10		ML	Ap Na Sm Su Te	177	+	A		
2351	11	F	Na Sm Su Te	177	+	A			
2355	12	F	Ap Cm Gm Na Sm Su Te To	177	+	A			
2330		05/00	14	ML <sup>e</sup>	Ap Cm Na Sm St Su Te	177	+	A	
2331			14	F <sup>e</sup>	Ap Cm Na Sm St Su Te	177	+	A	
2362			17	ML	Cm Sm St Su Te	177	∅	A	
2363		05/00	18	F	Ap Cm Gm Na Sm St Su Te To	177	+	A	
2376	Campanha	05/00	15	F	Cm Ne Sm St Su Te	177	∅	A	
2373			15	F	Cm St Su Te	177	∅	A	
2375			15	F	Cm St Su Te	177	∅	A	

\*F, feces; ML, mesenteric lymph nodes. <sup>a-e</sup>Same superscripts indicate samples taken from the same animal. Ut: Untype.

<sup>†</sup>Am., amikacin; Ap, ampicillin; Cf, cefaclor; Cm, chloramphenicol; Gm, gentamicin; Na, nalidixic acid; Ne, neomycin; Sm, streptomycin; St, sulfamethoxazole-trimethoprim; Su, sulfonamide; Te, tetracycline; To, tobramycin.

TABLE 2. Antimicrobial resistance profile, phage type, presence of O5 antigen and IS200 pattern of *S. Typhimurium* strains isolated in 2000 in slaughterhouse II.

Strain	Farm location	Isolation date	Farm number	Source *	Antimicrobial resistance †	Phage type	O5 antigen	IS200 pattern
2364	Missões	04/00	1	F	Su	177	+	A
2365			2	ML	Su	18	+	D
2332		07/00	3	ML <sup>a</sup>	Ne Su Te	194	∅	A
2333			3	F <sup>a</sup>	Cm Na Sm Te	177	+	A
2372			7	ML	Sm Su Te	194	∅	A
2336			3	ML <sup>b</sup>	Sm Su Te	194	∅	A
2337			3	F <sup>b</sup>	Na Ne Sm Su Te	Ut	+	A
2371			3	F	Na Ne Sm Su Te	192	+	A
2367			3	ML	Su Te	194	∅	A
2334			4	ML <sup>c</sup>	Su Te	194	∅	A
2335			4	F <sup>c</sup>	Su Te	194	∅	A
2368			5	ML	Su Te	194	∅	A
2370			4	ML	Sm St Su Te	194	∅	A
2366			6	F	Cm Na Sm St Su Te	177	+	A

\*F, feces; ML, mesenteric lymph nodes; SL, submandibular lymph node; T, tonsil. <sup>a-</sup>

<sup>c</sup>Same superscripts indicate samples taken from the same animal.

<sup>†</sup> see Table 1

TABLE 3. Antimicrobial resistance profile, phage type, presence of O5 antigen and IS200 pattern of *S. Typhimurium* strains isolated between 2000 and 2001 in slaughterhouse III.

Strain	Farm location	Isolation date	Farm number	Source *	Antimicrobial resistance †	Phage type	O5 antigen	IS200 pattern
2340	Vale	01/00	1	F	Cm Na Ne Sm St Su Te	192	+	A
2339			2	ML	-	99	∅	B
2341		05/00	3	ML	Su	8	+	C
2650		11/00	6	ML	Te	194	+	A
2664		05/01	9	SL	Sm Te	RDNC <sup>(2)</sup>	∅	A
2696		9	SL <sup>b</sup>	Na Sm Te	177	+	A	
2697		9	T <sup>b</sup>	Na Sm Su Te	177	+	A	
2693		9	T	Sm Su Te	RDNC <sup>(1)</sup>	∅	A	
2673		10	T	Sm Su Te	RDNC <sup>(1)</sup>	∅	A	
2676		10	SL	Sm Su Te	RDNC <sup>(1)</sup>	∅	A	
2671		10	T	Sm St Su Te	RDNC <sup>(1)</sup>	∅	A	
2677		11	SL	Sm Te	RDNC <sup>(1)</sup>	∅	A	
2690	12	SL	Na Te	177	+	A		
2644	Serra	09/00	4	F	Ap Cm Ne St Su Te	177	+	A
2645			4	ML	Ap Cm Ne Sm St Su Te To	177	+	A
2648		10/00	5	ML <sup>a</sup>	Gm Sm Su Te	RDNC <sup>(4)</sup>	+	A
2649		5	T <sup>a</sup>	Ap Gm Su St Te	177	+	A	
2651		12/00	7	ML	Te	68	+	A
2658		01/01	8	T	St Te	177	+	A

\*F, feces; ML, mesenteric lymph nodes; SL, submandibular lymph nodes; T, tonsil. <sup>a-b</sup>Same superscripts indicate samples taken from the same animal.

† see Table 1.

RDNC, strain react with typing phages, but do not conform with any definitive phage types

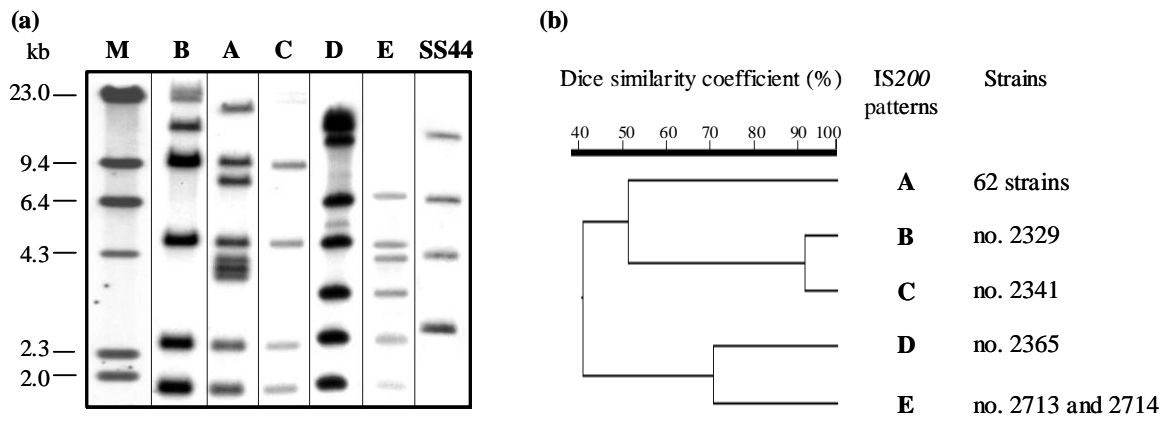


Figure 1: (a) Lanes A-E show the different IS200 hybridization patterns (A-E) of *S.* Typhimurium strains. Lane M contains the molecular weight marker Lambda DNA digested with *Hind*III Standard and lane SS44 contains *S.* Abortusovis strain. (b) Dendrogram showing the results of the cluster analysis on the basis of IS200 patterns.

## REFERENCES

- Anderson, E.S., Ward, L.R., Saxe, M.J. and de Sa, J.D. (1977) Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. *J Hyg (London)* **78**, 297-300.
- Ang-Küçüker, M., Tolun, V., Helmuth, R., Rabsch, W., Büyükbaba-Boral, O., Törümküney-Akbulut, D., Susever, S. and Ang, Ö. (2000) Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains isolated in Istanbul, Turkey. *Clin Microbiol Infect* **6**, 593-599.
- Ausubel, F.M., Brent, R. and Ringston R.E. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, New York. 1,600 p.
- Bessa, M.C., Costa, M. and Cardoso, M. (2004) Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. *Braz J Vet Res* **24**, 80-84.
- Beuzón, C.R., Chessa, D. and Casadesús, J. (2004) IS200: an old and still bacterial transposon. *Int Microbiol* **7**, 3-12.
- Castagna, S.M.F., Schwarz, P., Canal, C.W. and Cardoso, M. (2004) Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Scient Veterinariae* **32**, 141-147.
- Davies, P.R., Morrow, W.E., Jones, F.T., Deen, J., Fedorka-Cray, P.J. and Harris, I.T. (1997) Prevalence of *Salmonella* in finishing swine raised in different production systems in North Carolina, USA. *Epidemiol. Infect.* **119**, 237-244.



- Gebreyes, W.A. and Altier, C. (2002) Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. *J Clin Microbiol* **40**, 2813-22.
- Geimba, M.P., Tondo, E.C., Oliveira, F.A., Canal, C.W. and Brandelli, A. (2004) Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *J Food Prot* **67**, 1229-1233.
- Gudmundsdottir, S., Hardardottir, H. and Gunnarson, E. (2003) Subtyping of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium outbreak strains isolated from humans and animals in Iceland. *J Clin Microbiol* **23**, 4833-4835.
- Guilloteau, L., Wallis, T.S., Gautier, A.V., MacIntyre, S., Platt, D.J. and Lax, A. (1996) The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. *Infec Immun* **64**, 3385-3393.
- Gulig, P.A., Danbara, H., Guiney, D.G., Lax, A.J., Norel, F. and Rhen, M. (1993) Molecular analysis of *spv* virulence genes of *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* **7**, 825-830.
- Helms, M.S., Ethelberg, K., Mølbak and the DT104 Study Group (2005) An international survey of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infections in humans, with particular reference to DT104, 1992-2001. *Emerg Infect Dis* **11**, 859-867.
- Hurd, H.S., McKean, J.D., Wesley, I.V. and Karriker, L.A. (2001) The effect of lairage on *Salmonella* isolation from market swine. *J Food Prot* **64**, 939-944.
- Kauffmann, F. (1934) Über die serologische and kulturelle Varianten der Paratyphus D- und Mäusetyphus-Bacillen. *Z Hyg* **116**, 368-384.

- Millemann, Y., Lesage, M.C., Dancla, E.C. and Lafont, J.P. (1995) Value of plasmid profiling ribotyping and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol* **33**, 173-179.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), (2002) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals – Second edition: Approved standard M31-A2, NCCLS, Wayne, PA, USA.
- Olsen, J.E., Brown, D.J., Skov, M.N. and Christensen, J.P. (1993) Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. *Vet Quart* **15**, 125-135.
- Rabsch, W., Tschäpe, H. and Bäuml, A.J. (2001) Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infect* **3**, 237-247.
- Rabsch, W., Andrews, H.L., Kingsley, R.A., Prager, R., Tschäpe, H., Adams, L.G. and Bäuml, A.J. (2002) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun* **70**, 2249-2255.
- Rubino, S., Muresu, E., Solinas, M., Santona, M., Paglietti, B., Azara, A., Schiaffino, A., Santona, A., Maida, A. and Cappuccinelli, P. (1998) IS200 fingerprint of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium human strains isolated in Sardinia. *Epidemiol Infect* **120**, 215-222.
- Sauer, S., Pudich, U., Wermter, R., Gericke, B., Prager, R., Fruth, A., Brockhaus, E., Tschäpe, H. and Rabsch, W. (2001) An outbreak caused by *S. Typhimurium* DT177, BTa in Bavaria characterized by an unusual antibiotic resistance and plasmid profile. In 4<sup>th</sup> International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* and other foodborne pathogens in pork, Leipzig, Germany, pp.361-363.

- Schiaffino, A., Beuzón, C.R., Uzzau, S., Leori, G., Cappuccinelli, P., Casadesús, J. and Rubino, S. (1996) Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortusovis*. *Appl Environm Microbiol* **62**, 2375-2380.
- Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R. (1973) Numerical Taxonomy. W.H. Freeman, San Francisco. 573 p.
- Swanenburg, M., Urlings, H.A.P. and Snijders, J.M.A. (2001) *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. *Int J Food Microbiol* **70**, 243–254.
- Wegener, H.K. (2003) Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Curr Opin Microbiol* **6**, 439-445.

**CAPÍTULO 3: PERFIL DE REP E ERIC-PCR DE AMOSTRAS DE**  
*Salmonella enterica* sorovar Typhimurium **ISOLADAS**  
**DE SUÍNOS NO RIO GRANDE DO SUL**

CIÊNCIA RURAL, 2006

**Perfil de REP e ERIC-PCR de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium  
isoladas de suínos no Rio Grande do Sul**

**REP- and ERIC-PCR patterns of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium porcine  
strains isolated in Rio Grande do Sul**

Marjo Cado Bessa<sup>1</sup>; Alessandra Sella<sup>2</sup>; Cláudio Wageck Canal<sup>3</sup>; Marisa Cardoso<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – UFRGS

<sup>2</sup> Faculdade de Veterinária – UFRGS

<sup>3</sup> Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, 91 540-000, mcardoso@ufrgs.br

## RESUMO

*Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ST) tem sido altamente prevalente em suínos abatidos no Rio Grande do Sul. Métodos genotípicos de tipificação têm sido adotados com sucesso para identificar isolados de ST e elucidar a sua transmissão ao longo da cadeia de produção. O objetivo desse estudo foi aplicar a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase para amplificação de sequências repetitivas (rep-PCR) na discriminação de amostras de ST isoladas de suínos provenientes de diferentes granjas do Rio Grande do Sul. Um grupo de noventa e sete isolados de ST foram testadas por rep-PCR, usando primers para REP e ERIC. Foram também incluídos no estudo isolados de ST provenientes de outras regiões do Brasil e de outros países, além de representantes de outros sorovares. A técnica gerou um único padrão de bandas entre os isolados de ST. Diferenças nos padrões de bandas foram obtidas somente entre diferentes sorovares. A partir disso, concluiu-se que a técnica de rep-PCR não foi adequada para discriminação de amostras de ST isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.

**Palavras-chave:** *Salmonella* Typhimurium, suínos, genotipificação, REP-PCR, ERIC-PCR

## ABSTRACT

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium has been highly prevalent in slaughter pigs in Rio Grande do Sul (Brazil). In this regard, genotypic methods have been successfully adopted to trace ST strains on preharvest and at slaughter. Thus the aim of this study was to characterize ST porcine strains isolated from different farms located in Rio Grande do Sul, using the repetitive sequence polymerase chain reaction (rep-PCR). A set of ninety seven *Salmonella* Typhimurium porcine strains were tested by rep-PCR, using REP e ERIC primers. ST strains isolated in other region of Brazil, in other countries and strains belonging

to other serovars were also included in the study. The rep-PCR method produced an unique band pattern among the ST strains. However, differences in band patterns was detected among strains of other serotypes. These results suggest that rep-PCR cannot be considered suitable to discriminate ST strains isolated from pigs in Rio Grande do Sul.

**Keys words:** *Salmonella* Typhimurium, pigs, genotyping, REP-PCR, ERIC-PCR

## INTRODUÇÃO

*Salmonella enterica* é um importante patógeno envolvido em toxinfecções alimentares e sua presença em carcaças e derivados de suínos pode representar um sério risco à saúde pública, além de causar perdas econômicas na cadeia produtiva (WILCOCK & SCHWARTZ, 1993).

Em estudo realizado no Rio Grande do Sul (BESSA et al., 2004), encontrou-se prevalência de 55,6% de suínos portadores de *Salmonella enterica* ao abate, havendo o predomínio de *S. Typhimurium* entre os sorovares isolados. Esta prevalência elevada de portadores representa uma fonte de contaminação para outros animais e para o produto final como pode ser evidenciado em estudos conduzidos na mesma região (CASTAGNA et al., 2004).

A ampla distribuição do sorovar Typhimurium no ambiente e a diversidade de seus reservatórios constituem obstáculos à implementação de programas de controle em rebanhos suínos (BERENDS et al., 1996). A determinação da origem de isolados de *Salmonella* sp. contribui para elucidar a cadeia de transmissão no rebanho, na indústria e em casos de ocorrência de surtos, sendo componente importante em estudos epidemiológicos (SWANENBURG et al., 1998).

Diversos métodos genotípicos e fenotípicos têm sido propostos para tipificação de isolados de *Salmonella enterica*, sendo a fagotipificação e a eletroforese em campo pulsado (PFGE) consideradas técnicas padrão para esse propósito (OLSEN et al., 1993).

Várias classes de seqüências repetitivas de DNA estão presentes no genoma de procariotos (VERSALOVIC et al., 1991; HULTON et al., 1991), entre as quais encontram-se os elementos denominados REP (*repetitive extragenic palindrome*) e ERIC (*enterobacterial repetitive intergenic consensus*). A determinação do perfil de distribuição dessas seqüências repetitivas por meio da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (rep-PCR) tem sido reportada como uma alternativa, mais simples e menos onerosa, a outros métodos de genotipificação (VERSALOVIC et al., 1994; WEIGEL et al., 2001). A partir disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar a técnica de rep-PCR como ferramenta para a discriminação de linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de suínos no sul do Brasil.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Isolados de *Salmonella enterica*

Foram incluídos no estudo isolados de *Salmonella* Typhimurium provenientes de suínos, de surtos ocorridos no Brasil e em outros países, além de isolados de outros sorovares. Os isolados foram divididos em quatro grupos. O grupo 1 (G1) consistiu de 57 isolados de *Salmonella* Typhimurium provenientes de linfonodos, tonsilas e conteúdo intestinal de suínos, abatidos entre 1999 e 2001 em três matadouros-frigoríficos do Rio Grande do Sul. Os isolados haviam sido previamente fagotipificados (BESSA, 2006), pertencendo aos Tipos Definitivos (DT) 177 (n=35), 194 (n=7), 192 (n= 2), 99 (n=1), 8 (n=1), 68 (n=1), 18 (n=1), RDNC (Padrão de lise não classificável, n= 7) e dois isolados não-tipificáveis. Ao lado disso, amostras de *S. Typhimurium* provenientes de suínos (n=34),



e de embutidos de carne suína (n=6), isoladas em 2001 no Rio Grande do Sul, foram incluídos nesse grupo. Os isolados de ST incluídos no estudo foram provenientes de animais criados em 35 granjas distribuídas em quatro regiões geográficas do estado. Isolados de *Salmonella* sp. epidemiologicamente não relacionados foram incluídos nos demais grupos com a finalidade de verificar o poder de discriminação da técnica. O grupo 2 (G2) consistiu de quatro isolados de *Salmonella* Typhimurium envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar. Dois deles foram obtidos do Instituto Oswaldo Cruz e eram provenientes de fezes de pacientes de surtos ocorridos em 1999, nas regiões Sul e Sudeste. Os outros dois isolados eram relacionados a surtos ocorridos no Rio Grande do Sul, tendo sido obtidos de uma amostra de carne bovina e de fezes de suíno. Os dois isolados do Rio Grande do Sul haviam sido fagotipificados, sendo, respectivamente, DT193 e RDNC. O grupo 3 (G3) consistiu de oito isolados de *Salmonella* Typhimurium proveniente de casos de gastroenterite em humanos ocorridos na Tanzânia (n=3), Albânia (n=2), Zimbábue (n=2) e Itália (n=1). O grupo 4 (G4) foi constituído de seis isolados de cada um dos sorovares Bredeney, Agona, Panama, Derby, Enteritidis e *S. enterica* sub. *enterica* O:6,8.

## **2.2. Extração do DNA**

A preparação de DNA para a realização do rep-PCR, foi feita a partir de culturas de 18 h em LB, sendo 1 mL das culturas centrifugadas a 13.000 x g por 10 minutos. As células precipitadas foram lavadas duas vezes em NaCl 1M e centrifugadas a 13.000 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em TE (10 mM Tris HCl pH 8,0, 1 mM EDTA). O DNA total dos isolados foi extraído com isotiocianato de guanidina (Invitrogen- Life Technologies, Germany) conforme descrito por RADEMAKER & BRUIJN (1997). A concentração do DNA foi estimada usando brometo de etídio conforme descrito por SAMBROOK et al. (1997). As amostras de DNA e

concentrações definidas (20 ng/mL, 40ng/mL, 80 ng/mL e 100 ng/mL) de DNA do fago Lambda (Invitrogen- Life Techonologies do Brasil Ltda), foram individualmente acrescidos ao mesmo volume de brometo de etídio (2 µg/mL). A seguir, as amostras de DNA extraídas tiveram sua concentração estimada pela comparação da intensidade de sua fluorescência, verificada em transiluminador de luz ultravioleta, com aquelas verificadas com concentrações definidas de DNA de Lambda.

### **2.3 Condições do rep-PCR**

Os “primers” sintetizados (Invitrogen- Life Techonologies do Brasil Ltda) foram baseados nos descritos por VERSALOVIC et al. (1991): REP 1R-I (5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'), REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'), ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') e ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). As condições de amplificação foram baseadas em RADEMAKER & BUIJN (1997) com modificações. A reação foi realizada em um volume final de 25 µL que continha 2 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen-Life Techonologies do Brasil Ltda), 50 pmol/µL ou 70 pmol/µL dos oligonucleotídeos iniciadores REP ou ERIC, respectivamente, 1,25 mM/µL de cada deoxinucleotídeo (Invitrogen- Life Techonologies do Brasil Ltda), tampão de Gitschier (16,6 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 6,7 mM Tris-HCl pH 8,8; 6,6 mM MgCl<sub>2</sub>; 6,7 µM EDTA pH 8,8; 30 mM β-mercapto-etanol) e 200 ng de DNA.

Para a REP-PCR, o programa de amplificação foi constituído de um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 40°C por 1 min, extensão a 65°C por 8 min e uma extensão final de 65°C por 16 min. Para ERIC-PCR, o programa foi idêntico ao descrito para REP-PCR, exceto a

temperatura de anelamento utilizada (50°C, 1 min). Um controle negativo que continha todos os componentes, exceto o DNA alvo, foi incluído em cada amplificação. Os amplicons obtidos foram analisados em gel com 1,5% de agarose (GIBCO BRL-Life Technologies) a 5 V/cm em cuba de eletroforese horizontal. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizado e fotografado em transiluminador com luz ultravioleta. Para verificar o tamanho dos fragmentos amplificados, foi utilizado o 100 bp DNA Ladder (Invitrogen-Life Technologies do Brasil Ltda), como marcador molecular. Todas as amostras foram testadas pelo menos duas vezes usando GeneAmp PCR System 2400 Thermocycler (Applied Biosystems) para demonstrar a reprodutibilidade dos perfis obtidos.

#### **2.4 Análise dos dados**

Os perfis obtidos foram comparados visualmente, sendo consideradas as bandas encontradas entre 600 e 2100 bp, para ERIC-PCR e entre 600 e 2072 bp para REP-PCR. A construção dos dendrogramas foi feita a partir da análise de similaridade dos perfis pelo coeficiente de Dice e agrupamento por *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA), utilizando o programa NTSYS-PC Versão 1.7 (Applied Biostatistics,1992)

## **RESULTADOS**

As bandas menores que 600 bp e maiores que 2100 bp apresentaram difícil resolução tanto para ERIC- como para REP-PCR, não sendo, por isso, incluídas na análise. O perfil obtido com os oligonucleotídeos iniciadores ERIC (Figura 1) gerou padrões com 11 a 15 bandas, enquanto o perfil de REP (Figura 2) apresentou entre 11 e 12 bandas na região

analisada. Fragmentos conservados de aproximadamente 1.700 bp, 1.300 bp, 800 bp e 700 bp foram encontrados na maioria dos isolados no ERIC-PCR. Para REP-PCR, os fragmentos conservados entre isolados foram de aproximadamente 2072 bp, 1050 bp e 600 bp.

Os perfis obtidos para REP e ERIC foram indistinguíveis entre os isolados de *S. Typhimurium* provenientes de suínos abatidos no Rio Grande do Sul (Fig. 1 e 2, perfil A), nas quatro amostras de surtos isolados no Brasil (G2) e entre os demais isolados do sorovar *Typhimurium* epidemiologicamente não relacionados (G3). No grupo constituído por outros sorovares (G4), foram obtidos padrões de bandas distintos. O perfil ERIC-A (Figura 1) apresentou maior similaridade (91,7%) com o padrão E (*S. Panamá*), sendo o perfil ERIC-D (Agona, 78,7%) o mais distante. Por outro lado, o padrão REP-A (Figura 2) foi mais próximo (90,3% de similaridade) do padrão REP-G (Enteritidis), enquanto o perfil ERIC-F (*S. Derby*) apresentou a menor similaridade (77,8 %). Entretanto foi o isolado de *S. enterica* sub. *enterica* O:6,8 (Padrão B) que apresentou a maior distância dos perfis ERIC-A (32%) e REP-A (43,1%).

## DISCUSSÃO

O objetivo desse estudo foi avaliar a técnica de rep-PCR, utilizando oligonucleotídeos para sequências REP e ERIC, como uma ferramenta para discriminar isolados de *Salmonella Typhimurium* provenientes de suínos no Rio Grande do Sul, uma vez que a mesma tem sido apontada como uma alternativa mais rápida e menos onerosa para caracterização de microrganismos (WEIGEL et al., 2001).

Era esperado que as amostras isoladas de suínos (G1) apresentassem diferentes perfis tanto na REP-PCR como na ERIC-PCR, uma vez que eram provenientes de 35 granjas localizadas em diferentes municípios do Rio Grande do Sul. Ao lado disso, o fato

dos animais pertencerem a criações integradas de três empresas que adotam diferentes protocolos de manejo, recebem animais de origens distintas, produzem sua própria ração e abatem os animais em matadouro-frigorífico próprio, torna pouco provável que a cadeia de transmissão de *Salmonella* sp. apresente pontos em comum. Entretanto, todos os 97 isolados apresentaram apenas o perfil A, indistinguível mesmo entre aqueles isolados previamente discriminados por fagotipificação.

Vários estudos têm apontado a rep-PCR como uma técnica adequada para estudos epidemiológicos, sendo possível a discriminação em diferentes grupos bacterianos. VERSALOVIC et al. (1991), utilizando os mesmos pares de oligonucleotídeos do presente estudo, concluíram que o rep-PCR poderia discriminar espécies e linhagens bacterianas. BORGES et al. (2003) utilizaram REP-PCR para demonstrar a diversidade existente entre isolados de *E. coli* em amostras de água do Arroio Feijó no Rio Grande do Sul. BEYER et al. (1998) diferenciaram vários sorovares de *Salmonella* e, entre isolados do sorovar Saintpaul, aqueles provenientes de alimentos e humanos acometidos por salmonelose. SWANENBURG et al. (1998) padronizaram a técnica de ERIC-PCR com 744 *Salmonella* isoladas de suínos ao abate e do ambiente de frigorífico. Nesse estudo, foram identificados 15 perfis diferentes em 12 sorovares encontrados, sendo que os sorovares Typhimurium, Brandenburg e Livingstone apresentaram mais de um perfil entre seus isolados. SOTO et al. (2001) encontraram reprodutibilidade na discriminação de linhagens de *S. Panama* isoladas de surtos e de casos esporádicos em humanos, quando utilizaram ERIC-PCR.

A associação de mais de um par de oligonucleotídeos iniciadores na técnica de rep-PCR aumenta seu poder discriminatório (OLIVE & BEAN, 1999), sendo, portanto, recomendada. WEIGEL et al. (2001) compararam rep-PCR (REP, ERIC e BOX) com a PFGE, considerada padrão ouro na tipificação de *Salmonella* sp., para detecção de

diversidade genética e discriminação entre isolados provenientes de uma unidade de produção de suínos. Ambas as técnicas foram capazes de diferenciar isolados do mesmo sorovar, no entanto, devido ao custo e a habilidade de discriminar entre isolados relacionados, os autores recomendaram a adoção da rep-PCR para estudos de transmissão de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva. Ao contrário, no presente estudo, mesmo a combinação dos perfis obtidos para ERIC e REP resultaram em apenas um padrão para todos os 97 isolados de *S. Typhimurium* provenientes de suínos, não tendo sido útil para a diferenciação.

Apesar dos relatos existentes sobre o bom poder discriminatório da rep-PCR, o resultado encontrado está de acordo com outros estudos. VAN LITH & AARTS (1994), apesar de diferenciarem sorovares de *Salmonella* sp., não conseguiram discriminar *S. Typhimurium* de um mesmo fagotipo. Da mesma forma, MILLEMANN et al. (1996) e LOPEZ-MOLINA et al. (1998) demonstraram o baixo poder de discriminação da ERIC-PCR para *S. Enteritidis*. Também OLIVEIRA (2003) encontrou um baixo poder de discriminação da rep-PCR (REP, ERIC e BOX) em amostras de *S. Enteritidis* isoladas de frangos, suínos, humanos e alimentos envolvidos em surtos no sul do Brasil, no período de 1995 a 2001.

Uma vez que os métodos de tipificação devem ser aptos a diferenciar linhagens não relacionadas, assim como aquelas provenientes de áreas geográficas distintas num mesmo período de tempo (OLIVE & BEAN, 1999), foram incluídos no estudo isolados provenientes de surtos ocorridos em outras regiões do Brasil, bem como de outros países e que, portanto, não tinham relação epidemiológica provável com os isolados de suínos. Apesar disso, os isolados do G2 e G3 geraram o mesmo perfil de bandas encontradas no G1.

Por outro lado, no presente estudo, foi possível discriminar sorovares distintos, isolados de suínos provenientes das mesmas granjas, conforme pode ser constatado entre os

isolados do G4 (Fig. 1 e 2). Os mesmos resultados foram encontrados por VAN LITH et al. (1994) que discriminaram, por meio de ERIC-PCR, isolados provenientes de frangos, pertencentes a diferentes sorovares de *Salmonella*. Entretanto, mesmo entre sorovares distintos, o índice de similaridade encontrado no presente estudo foi bastante elevado, acima de 78,7% para ERIC-PCR e 77,8 % para REP-PCR. Apenas o isolado pertencente a um sorogrupo (O:6,8) distinto dos demais sorovares incluídos no estudo foi colocado em grupo mais distante.

Outra limitação que tem sido apontada na técnica de rep-PCR é a ausência de reprodutibilidade dos perfis obtidos em diferentes termocicladores ou em diferentes ampliações realizadas sob as mesmas condições (JOHNSON & CLABOTS, 2000). Segundo SWANENBURG et al. (1998) apenas perfis resultantes de uma mesma amplificação e documentados em um mesmo gel de agarose poderiam ser comparáveis. No presente estudo, a técnica foi reprodutível, apresentando um perfil homogêneo de bandas entre as repetições realizadas. Apenas uma banda de aproximadamente 600 bp apareceu em algumas ampliações realizadas na ERIC-PCR (Figura 1), resultando no perfil denominado A'. Uma vez que a referida banda não foi reprodutível na maioria das ampliações realizadas, esse padrão não foi considerado na análise dos dados.

As diferenças em termos do sucesso da técnica de rep-PCR na discriminação de *Salmonella* sp. pode estar relacionada com a origem dos isolados incluídos nos diversos estudos, apresentando isolados provenientes de amostras ambientais maior diversidade do que aqueles provenientes de indivíduos infectados (BURR et al., 1998). Apesar da possível clonalidade encontrada em amostras de *Salmonella* sp. isoladas a partir de hospedeiros portadores numa área geográfica restrita; os resultados obtidos pelo rep-PCR no presente

estudo parecem estar mais relacionados com a incapacidade de discriminação da técnica em isolados de *S.Typhimurium*, devendo ser testadas outras técnicas para esse propósito.

### CONCLUSÃO

A rep-PCR, utilizando os oligonucleotídeos para ERIC e REP, não foi capaz de discriminar amostras de *S.Typhimurium* isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERENDS, B.R.et al. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 37-53, 1996.
- BESSA, M. C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* enterica sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.** 2006. Tese de Doutorado – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- BESSA, M. C. et al. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 80-84, 2004.
- BEYER et al. Suitability of Repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella* enterica serovar Saintpaul. **Journal of clinical Microbiology**, v. 36, p. 1549-1554, 1998.
- BORGES, L.G.A. et al. Characterisation and genetic diversity via REP-PCR of *Escherichia coli* isolates from polluted waters in southern Brazil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 45, p. 173-180, 2003.



- BURR M. D. et al. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.24-30, 1998.
- CASTAGNA, S.M.F. et al.. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* ao abate e contaminação de embutidos frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 141-147, 2004.
- HULTON, C.S.J. et al. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Molecular Microbiology**, v.5, n.4, p.825-834, 1991.
- JOHSON, J.; CLABOTS, C. Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 7, n. 2, p. 258-264, 2000.
- LÓPEZ-MOLINA, N. et al. Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types of PCR fingerprinting. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 877-882, 1998.
- MILLEMANN Y. et al. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **Immunology and Medical Microbiology**, v.14, p.129-134, 1996.
- OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.
- OLIVEIRA, S.D. **Detecção de *Salmonella* sp. E Caracterização de isolados de *Salmonella enteritidis* pela presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e por rep-PCR fingerprinting.** 2003. 141f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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

RADEMAKER, J.L.W.; de BRUIJN, F.J. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis. In: CAETANO-ANOLLES, G.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Saran wrap method, Appendix E6. In:\_\_\_\_\_. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. New York: CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 1997. p. 151-171

SOTO S. M. et al. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.35-43, 2001.

SWANENBURG, M. et al. Validation of ERIC PCR as a tool in epidemiologic research of *Salmonella* in slaughter pigs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 141-144, 1998.

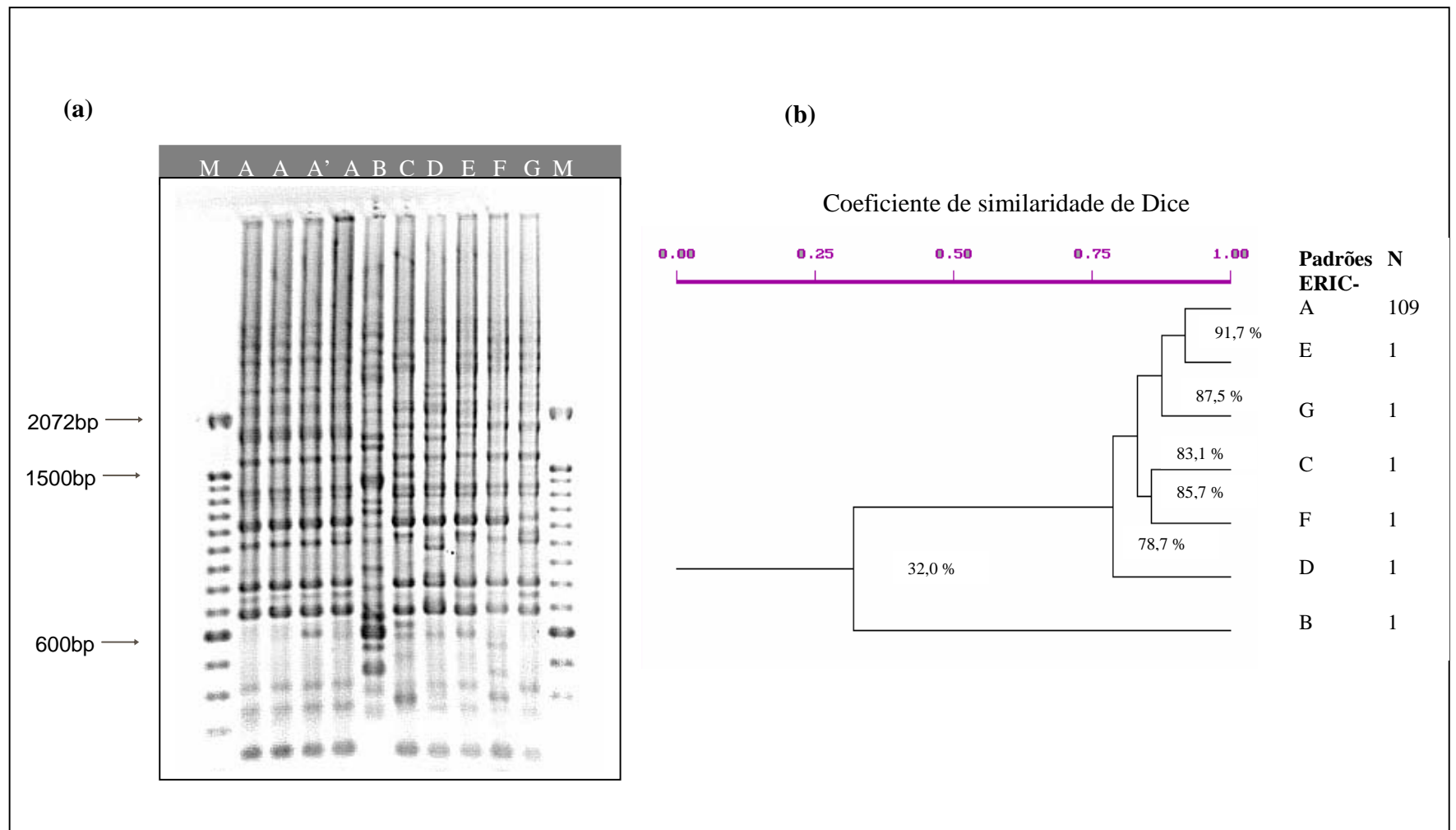
VAN LITH, L. A. et al. Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 19, p. 273-276, 1994.

VERSALOVIC, J. et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 6823-6831, 1991.

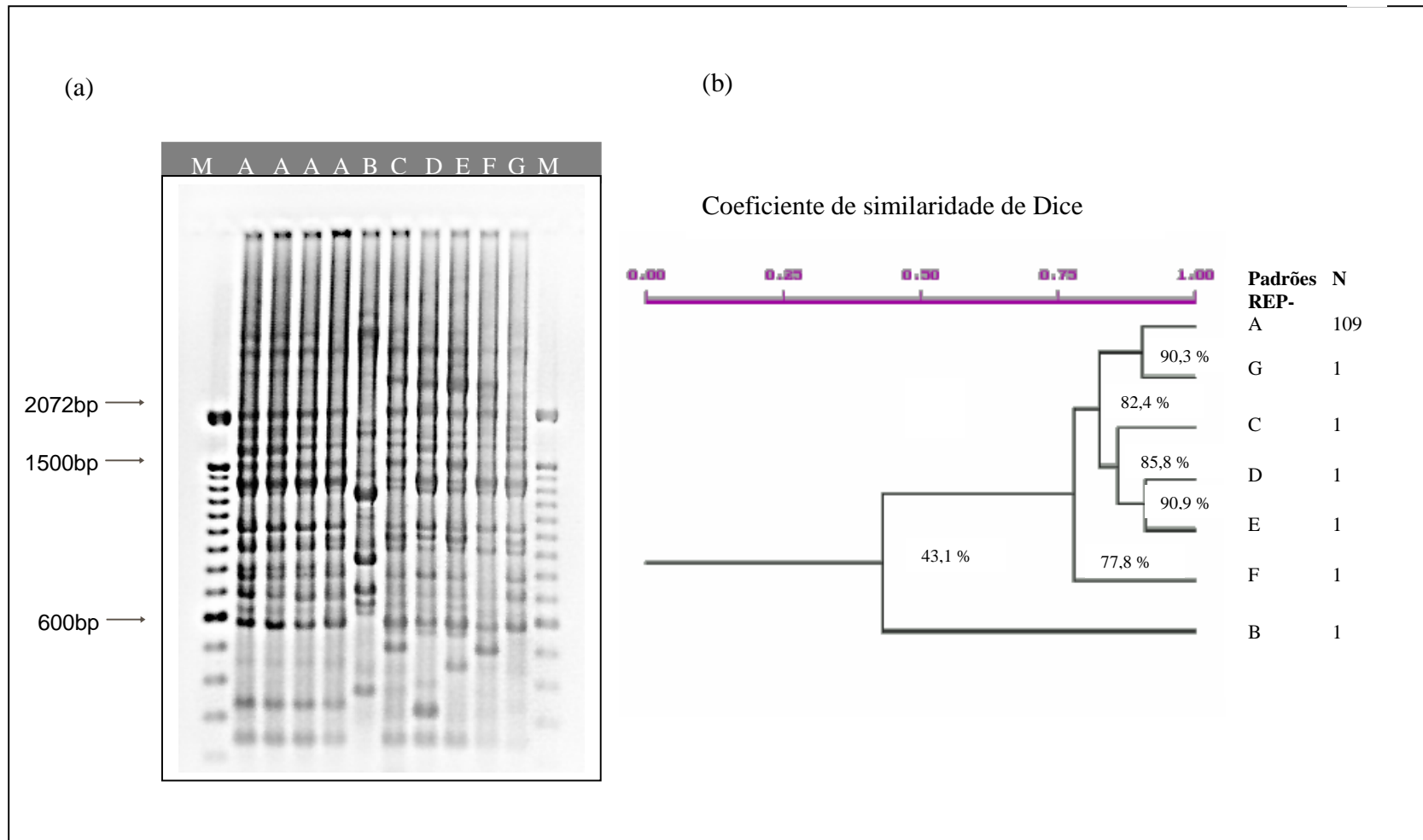
VERSALOVIC, J. et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p. 25-40, 1994.

WEIGEL, R.M. et al. Identification of patterns of transmission of *Salmonella* within swine production systems using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and repetitive sequence polymerase chain reaction (REP-PCR): a quantitative analysis. *Berliner- Muenchener Tieraerztliche Wochenschrift*, v., p. 566-573, 2001.

WEIGEL R. M. et al. Comparison of pulsed field electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. ***Veterinary Microbiology***, v.100, p.205-217, 2004.



**Figura 1.** (a) Padrão de bandas de ERIC-PCR de *Salmonella enterica* obtido com os oligonucleotídeos ERIC1R e ERIC2 (a).Linhas 1 e 12: marcador molecular- DNA Ladder 100bp (M); Linhas 2 a 5: padrão encontrado em isolados do G1, G2 e G3 (*S. Typhimurium*, padrão A); Linha 6: *S. enterica* sub. *enterica* O:6,8 (perfil B); Linha 7: *S. Bredeney* (perfil C); Linha 8: *S. Agona* (perfil D); Linha 9: *S. Panamá* (perfil E); Linha 10: *S. Derby* (perfil F); Linha 11: *S. Enteritidis* (perfil G). (b) Dendogramas mostrando a relação dos diferentes padrões. A análise da similaridade foi realizada usando o coeficiente de Dice e o agrupamento gerado por UPGMA.



**Figura 2.** (a) Padrão de bandas de REP-PCR de *Salmonella enterica* obtido com os oligonucleotídeos REP 1R-I e REP2-I. (a).Linhas 1 e 12: marcador molecular- DNA Ladder 100bp (M); Linhas 2 a 5: padrão encontrado em isolados do G1, G2 e G3 (*S. Typhimurium*, padrão A); Linha 6: *S. enterica* sub. *enterica* O:6,8 (perfil B); Linha 7: *S. Bredeney* (perfil C); Linha 8: *S. Agona* (perfil D); Linha 9: *S. Panamá* (perfil E); Linha 10: *S. Derby* (perfil F); Linha 11: *S. Enteritidis* (perfil G). (b) Dendogramas mostrando a relação dos diferentes padrões. A análise da similaridade foi realizada usando o coeficiente de Dice e o agrupamento gerado por UPGMA.

**CAPÍTULO 4: SUBTIPIFICAÇÃO DE *Salmonella enterica* SEROVAR  
TYPHIMURIUM ISOLADAS DE SUÍNOS**

**SUBTIPIFICAÇÃO DE *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHIMURIUM  
ISOLADAS DE SUÍNOS**

**SUBTYPING OF *Salmonella enterica* SEROVAR TYPHIMURIUM ISOLATED  
FROM PIGS**

Marjo Cado Bessa<sup>1</sup>; Geovana Brenner Michael<sup>2</sup>; Cláudio Wageck Canal<sup>3</sup>; Marisa Cardoso<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Farmacêutica, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS

<sup>2</sup> Farmacêutica, Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – UFRGS

<sup>3</sup> Méd. Vet., Prof. Adjunto, Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Veterinária, UFRGS

<sup>4</sup> Méd. Vet., Prof. Titular, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, 91 540-000, mcardoso@ufrgs.br

## RESUMO

*Salmonella* Typhimurium (ST) é reconhecido como um dos sorovares mais prevalentes em suínos no sul do Brasil. A transmissão da *Salmonella* entre humanos e animais tem sido associada a alimentos de origem animal, incluindo o suíno. Técnicas fenotípicas e moleculares podem ser empregadas para rastrear isolados na granja e no matadouro, bem como para identificar linhagens envolvidas em surtos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi utilizar a fagotipificação e PFGE na caracterização de 97 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas entre 1999 a 2001 de suínos abatidos em três diferentes frigoríficos no Rio Grande do Sul. Os isolados foram classificados em doze fagotipos e foram encontrados doze diferentes padrões de macro-restrição, havendo um predomínio de isolados DT177 (47) com padrão A de PFGE. A associação das duas técnicas propiciou um melhor índice de discriminação ( $D=0,87$ ), comparado à fagotipificação ( $D=0,72$ ) e ao PFGE ( $0,56$ ) isoladamente, provando ser uma alternativa adequada para a caracterização de ST. Ao lado disso, linhagens clonais puderam ser identificadas nos isolados colhidos nessa região, indicando que podem haver pontos comuns na cadeia de transmissão de ST em suínos nessa região.

**Palavras-chave:** *Salmonella* Typhimurium, suínos, fagotipificação, resistência a antimicrobianos, PFGE

## ABSTRACT

*Salmonella* Typhimurium has been recognized as one of the most prevalent serovars in pigs in southern Brazil. Transmission of *Salmonella* from animals to human has been related to food consume, including pork. Phenotypic and molecular methods can be used to trace isolates on farm, in slaughterhouses and to identify strains involved in outbreaks. Thus the



aim of this study was to characterize 97 *Salmonella* Typhimurium strains collected between 1999 and 2001 from slaughter pigs at three different slaughterhouses located in Rio Grande do Sul by phage typing and PFGE. Twelve phage types and twelve different patterns of macrorestriction were found, being strains DT177 showing pattern A from PFGE the most prevalent. The association of both methods resulted in a better discrimination ( $D=0.87$ ) of ST strains, compared to phage typing ( $D=0.72$ ) or PFGE (0.56) alone. Clonal strains could be detected among the set of porcine isolates of this region, suggesting that common points can be present in the *Salmonella* transmission chain.

**Keys words:** *Salmonella* Typhimurium, pigs, phage typing; antimicrobial resistance, PFGE

## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella enterica* sub. *enterica* (*S.*) sorovar Typhimurium é reconhecida como um importante patógeno para humanos (DALY & FANNING, 2000). A transmissão do gênero *Salmonella* de animais para humanos tem sido associada ao consumo de alimentos de origem animal (MURPHY et al, 2001; MAGUIRE et al 1993; PONTELLO et al. 1998).

*S.* Typhimurium tem sido o sorovar mais prevalente em suínos levados ao abate no Rio Grande do Sul (BESSA et al., 2004) e foi igualmente isolado de cortes de pernil e embutidos de carne suína na mesma região (BANDEIRA et al., 2003; CASTAGNA et al., 2004). A elevada prevalência de *S.* Typhimurium encontrada na região demonstra que o suíno, através da carne e seus derivados, pode representar uma fonte de infecção para humanos.

Técnicas de tipificação podem ser utilizadas para a detecção da fonte de infecção em casos de surtos e para monitorar a circulação de clones em uma população ao longo do

tempo (MASLOW & MULLIGAN, 1996). Quando um método de tipificação demonstra ser incapaz de discriminar isolados durante uma investigação epidemiológica, é necessário associar outros métodos moleculares ou fenotípicos até que uma melhor diferenciação seja alcançada (LIEBANA et al., 2002).

Para a subtipificação de linhagens de *S. Typhimurium*, diversas técnicas fenotípicas e genotípicas têm sido propostas com grau de sucesso variável (OLSEN et al., 1993). Entre essas, a fagotipificação, o perfil de resistência a antimicrobianos, a distribuição de seqüências de inserção *IS200* e o rep-PCR vêm sendo amplamente utilizadas (MILLEMAN 1995, GUERRA 2000; SANDVANG, 2000; BENDER 2001; WEIGEL et al., 2001).

A clivagem do DNA genômico com enzimas de restrição seguido de eletroforese em campo pulsado (PFGE) tem sido proposto para a discriminação de *S. Typhimurium* associada à aplicação de métodos de tipificação tradicionais como a fagotipificação (MURASE et al 1995; SANDVANG et al., 2000; BENDER et al., 2001; BOTTELDOORN et al., 2004), e é considerada uma técnica de referência por ter um elevado poder de discriminação (OLIVE & BEAN, 1999).

Amostras de *S. Typhimurium* isoladas de suínos no sul do Brasil têm demonstrado uma clonalidade considerável, não tendo sido possível sua discriminação por meio de rep-PCR e padrão de inserção de seqüências *IS200* (BESSA, 2006).

A partir disso, no presente estudo investigou-se a diversidade de isolados de *S. Typhimurium* provenientes de suínos abatidos no Rio Grande do Sul, por meio da técnica de PFGE associada à fagotipificação.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***2.1. Isolados bacterianos***

Foram analisados 97 linhagens de *S. Typhimurium* provenientes de estudos prévios (BESSA et al., 2004; CASTAGNA, 2004). Estas *S. Typhimurium* foram isoladas de linfonodos submandibulares e mesentéricos, tonsilas, conteúdo intestinal e embutido de carne suína provenientes de animais de 35 granjas localizadas em quatro diferentes áreas geográficas do Rio Grande do Sul (Vale, Serra, Missões e região da Campanha).

O grupo de amostras era composto por 57 linhagens isoladas em 1999-2000 de suínos abatidos em três matadouros-frigoríficos (designados I, II, III) localizados no Rio Grande do Sul. Essas linhagens haviam sido previamente caracterizados por fagotipificação e pertenciam aos Tipos Definitivos (DT) 177 (n=35), 194 (n=7), 192 (n= 2), 99 (n=1), 8 (n=1), 68 (n=1), 18 (n=1), RDNC (Padrão de lise não classificável; n= 7) e dois isolados não-tipificáveis (UT). A maioria dos isolados (n=54) apresentou um único perfil de inserção de IS200 e não apresentava a região *spvR* (Bessa, 2006).

Ao lado disso, foram incluídas 40 linhagens de *S. Typhimurium* (39 provenientes do frigorífico III e uma do frigorífico II) isoladas em 2000-2001.

### ***2.2 Fagotipificação e presença de antígeno O5***

Todos os isolados foram fagotipificados no “Robert Koch Institut, Wernigerode Branch, National Reference Center for Salmonellae and other Enterics, Germany”. A fagotipificação foi realizada segundo o sistema ampliado de Anderson (Anderson et al., 1977). A presença do antígeno O5 foi determinada como descrito previamente (KAUFFMANN 1934), para diferenciar entre o sorovar *Typhimurium*, o qual possui o antígeno O5, e a sua variante antigênica Copenhagen, na qual o antígeno O5 está ausente.

## **2.2 Perfil de resistência a antimicrobianos**

Os 40 isolados de *S. Typhimurium* isolados em 2000-2001 foram testados pelo método da difusão em ágar Mueller-Hinton (Merk, Darmstadt) e o resultado avaliado de acordo com o documento M31-A2 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002). Foram utilizados para o teste os seguintes agentes antimicrobianos : amicacina (Am, 30 µg), ampicilina (Ap, 10 µg), cefaclor (Ce, 30 µg), ciprofloxacina (Ci, 5 µg), cloranfenicol (Cm, 30 µg), gentamicina (Gm, 10 µg), ácido nalidíxico (Na, 30 µg), neomicina (Ne, 30 µg), tetraciclina (Te, 30 µg), tobramicina (To, 10 µg), estreptomicina (Sm, 10 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (St, 25 µg) e sulfonamida (Su, 300 µg).

## **2.4. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)**

A preparação do DNA total, para a realização da eletroforese em campo pulsado (PFGE), foi realizada como descrito previamente (SCHWARZ AND LIEBISCH, 1994; LIEBISCH AND SCHWARZ, 1996). O DNA cromossomal, incluído em “plugs” de agarose, foi incubado por 18 h a 37°C na presença de 20 U da enzima de restrição *Xba*I (Promega, Madison WI, USA). Os fragmentos gerados foram separados em eletroforese de campo pulsado, a 14°C no sistema CHEF – DR II (BioRad, USA) por 24h a 5,6 V/cm com 0,5 x TBE como tampão de eletroforese, utilizando agarose (1%) certificada para PFGE (BioRad, USA). Os pulsos utilizados foram: fase um de 10 – 30s por 11h e fase dois de 30 – 50s por 13h. Para a visualização, o gel foi corado com brometo de etídio (2 µg/mL) por 10 min, descorado em água destilada por 30 minutos e fotografado sobre transiluminador de luz ultravioleta. Os fragmentos da *Xba*I de *Salmonella Typhimurium* LT2 foram utilizados como marcador de peso molecular (Liu et al., 1993).

### **2.5 Análise dos fragmentos:**

Os padrões da macrorestrição obtidos foram analisados visualmente, sendo considerados isolados diferentes os que apresentassem um fragmento de restrição distinto. As similaridades entre os padrões foram calculadas usando o coeficiente de Dice e agrupados usando o *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Average* (UPGMA).

### **2.6 Determinação do Índice de Discriminação (D):**

O poder de discriminação das técnicas de fagotipificação e PFGE foi determinado pelo Índice de Discriminação descrito por HUNTER & GASTON (1988). O valor D indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso na população testada serem classificados em grupos diferentes.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A aplicação de métodos fenotípicos e genotípicos em estudos prévios conduzidos com 57 isolados de *S. Typhimurium* provenientes de suínos não havia alcançado uma discriminação satisfatória (BESSA, 2006). Assim, com o objetivo de verificar diferenças não detectadas anteriormente, aplicou-se a eletroforese em campo pulsado (PFGE), por ser uma técnica de elevado poder de discriminação e por ser adotada como referência em estudos epidemiológicos envolvendo *Salmonella* sp. (LETELLIER et al., 1999; LIEBANA et al., 2002).

Ao lado disso, foram incluídos outros 40 isolados de *S. Typhimurium* obtidos em período e granjas distintas, com o objetivo de ampliar a diversidade da origem das linhagens analisadas. Para que os isolados incluídos também fossem caracterizados pelas mesmas técnicas aplicadas aos 57 isolados já analisados, foi conduzida a fagotipificação e a determinação do perfil de resistência a antimicrobianos dos mesmos (Tabela 1).

Entre os isolados incluídos, dois não foram tipificáveis (UT) e 19 reagiram com alguns fagos, mas não confirmaram nenhum padrão, sendo designados de RDNC. Dois diferentes padrões de RDNC foram detectados nestas linhagens, RDNC1 (n=15) e RDNC2 (n=4). Os 19 isolados restantes foram classificados em quatro fagotipos DT177 (12), DT193 (5), DT126A (1) e DT 194 (1).

Linhagens RDNC e DT177 já haviam sido predominantes entre os isolados obtidos no ano de 2000 no mesmo matadouro-frigorífico (BESSA, 2006), demonstrando que os fagotipos tendem a permanecer circulando nos sistemas de produção integrados ao longo do tempo. O fagotipo DT177 não tem sido identificado freqüentemente em isolados de origem suína, sendo o fagotipo DT104 o mais encontrado mundialmente nessa espécie (HELMS et al., 2005). Apesar disso, os isolados DT177 podem representar um risco para a saúde da população, uma vez que casos de salmonelose em humanos, causados pelo fagotipo DT177 foram identificados na Dinamarca (WEGENER et al., 1994) e na Alemanha (SAUER et al., 2001), este último relacionado ao consumo de produto de origem suína.

Quatro das seis linhagens de *S. Typhimurium* provenientes de embutido foram DT 193, sendo esse fagotipo encontrado apenas entre isolados dessa origem. Ao contrário do DT177, o fagotipo DT193 tem sido freqüentemente implicado em casos de infecção em humanos em vários países, inclusive associado ao consumo de produtos de origem suína (MAGUIRE et al. 1993, PONTELLO et al., 1998, ANG-KUÇUKER et al. 2000; PALMER et al., 2000; GEBREYES & ALTIEU, 2002).

Vinte e cinco isolados foram identificados como *S. Typhimurium* variante Copenhagen, sendo distribuídos nos seguintes fagotipos: RDNC1 (15), RDNC2 (4), DT193 (2), DT194 (1), DT177 (2) e DT126A (1). Da mesma forma como anteriormente relatado

(BESSA, 2006), os isolados RDNC foram predominantemente classificados como pertencentes à variante Copenhagen.

Entre os 40 isolados testados no presente estudo (Tabela 1), encontrou-se resistência à tetraciclina (95,0%), estreptomicina (87,5%), sulfonamida (47,5%), cloranfenicol (22,5%), ácido nalidíxico (37,5%), sulfametoxazol-trimetoprima (17,5%), ampicilina (5,0%), tobramicina (5,0%), gentamicina (5,0%). Todos os isolados foram sensíveis a ciprofloxacina, neomicina, amicacina e cefaclor. Somente um isolado foi sensível a todos os antimicrobianos testados, enquanto 12 isolados (30%) apresentaram multiresistência (quatro ou mais antimicrobianos). Em comparação com os isolados de 1999-2000 (BESSA, 2006), houve uma continuidade no predomínio de amostras resistentes à tetraciclina, estreptomicina e sulfonamida, o que está provavelmente relacionado com a ampla utilização desses antimicrobianos na suinocultura (GEBREYES et al., 2004). A aparente diminuição no número de amostras multi-resistentes pode ser explicada pela origem predominante dos isolados incluídos no presente estudo (Frigorífico III). BESSA (2006) havia identificado uma relação entre a origem das amostras e o perfil de multi-resistência, o que está provavelmente relacionado com os protocolos de administração de antimicrobianos adotados em diferentes empresas de integração de suínos, gerando uma pressão de seleção de resistência diferenciada entre os sistemas de produção.

Observou-se uma concentração de linhagens multi-resistentes no fagotipo DT193 isolado de amostras de embutido, demonstrando o risco de linhagens multiresistentes chegarem até o consumidor através dos alimentos contaminados.

Ao serem caracterizados pela técnica de PFGE, os 97 isolados de *S. Typhimurium* apresentaram 12 diferentes padrões de macro-restrição, apresentando entre 12 e 14 fragmentos com tamanhos de aproximadamente 50 a 800 Kb (Figura 1). Pelo menos oito

fragmentos foram comuns a todos os padrões. O padrão mais comum, A, incluiu 64 isolados (66%) e foi detectado em 24 granjas diferentes de integrados dos três frigoríficos.

Quatro padrões apresentaram um único isolado (B, C, H e J). Apenas uma banda diferenciou os padrões F/K e E/C, que foram os mais próximos entre si (96% de similaridade). Foram formados dois agrupamentos, sendo 87 isolados incluídos num grupo, enquanto os 10 isolados restantes formaram um segundo agrupamento com 74,2% de similaridade com o primeiro. Nesse segundo agrupamento (padrão L e J) encontram-se três isolados que haviam sido anteriormente discriminados pelo perfil de inserção de *IS200* e os três isolados que possuíam a região *spvR* (BESSA, 2006).

Apesar de alguns autores adotarem como critério, para considerar dois isolados como diferentes, um mínimo de sete fragmentos distintos (TENOVER et al 1995), a baixa diversidade encontrada entre isolados de *Salmonella* sp. tem resultado na classificação de isolados com apenas uma banda distinta como representantes de um genótipo. LACONCHA et al., (1998) obtiveram dez diferentes padrões de PFGE quando uma única banda foi considerada diferente. LIEBANA et al. (2002) também consideraram que a diferença de pelo menos um fragmento de restrição nos padrões de PFGE de *Salmonella* sp. era critério para distinguir entre as diferentes linhagens.

Dentro do padrão A do PFGE seis diferentes fagotipos, DT177, DT192, DT193, DT194, RDNC'1 e RDNC'2, puderam ser identificados, sendo que três isolados foram não tipificáveis (Tabela 2). Por outro lado, dentro do fagotipo DT177, predominante entre os isolados analisados, sete diferentes genótipos (A, D, E, F, H, I e K) foram discriminados.

Os isolados de *S. Typhimurium* do frigorífico III que não confirmaram com nenhum fagotipo (RDNC) produziram padrões de PFGE que foram indistinguíveis daqueles



das linhagens DT177, sugerindo que estas linhagens RDNC podem ser proximamente relacionadas com esse fagotipo.

A técnica de PFGE foi útil na discriminação de isolados do Frigorífico I, que haviam sido classificados num único fagotipo (DT177). Por outro lado, no Frigorífico III a classificação de 58 isolados em onze fagotipos permitiu uma maior discriminação do que havia sido alcançada por meio do PFGE (nove padrões). Estudos prévios relataram que diferentes fagotipos podem apresentar o mesmo perfil de PFGE (LACONCHA et al. 1998; NAVERBY et al., 2000; HUDSON et al., 2001), enquanto que dentro de um único fagotipo diferentes subtipos de genotipificação podem ser encontrados (BOOTTELDORN et al., 2004). A exemplo disso, KARIUKI et al. (2000) utilizaram a fagotipificação e a PFGE para analisar isolados de *S. Typhimurium* provenientes de pacientes humanos de uma cidade do Quênia, encontrando 11 fagotipos combinados com oito diferentes padrões de PFGE.

Apesar dos 97 isolados analisados terem sido classificados em 12 fagotipos diferentes e terem sido igualmente agrupados em 12 padrões de macro-restrição, a técnica de PFGE demonstrou ter um índice de discriminação ( $D=0,56$ ) inferior ao determinado para a fagotipificação ( $D= 0,72$ ), refletindo a maior concentração de isolados no perfil predominante (A). Entretanto, a combinação das duas técnicas gerou um  $D$  igual a 0,87, significando que um isolado aleatório escolhido nessa população apresentava 87% de chance de ser classificado em um grupo distinto. Considerando que alguns isolados foram provenientes de uma mesma granja e poderiam ser um mesmo clone, a combinação dessas duas técnicas provavelmente seja de grande utilidade para a investigação epidemiológica da infecção por *Salmonella* sp. em suínos.

A clonalidade dentro de uma população de bactérias é definida como a probabilidade de dois isolados serem relacionados entre si. O nível de confiança dessa

probabilidade, por sua vez, aumentará proporcionalmente ao número de técnicas aplicadas para a diferenciação dos isolados (OLSEN et al., 1993). Considerando que as técnicas utilizadas no presente estudo permitiram uma discriminação adequada, pode-se supor que existia uma linhagem clonal predominante do sorovar Typhimurium isolado de suínos no Rio Grande do Sul no período de 1999-2001, representada pelo fagotipo DT177 que apresentava padrão A no PFGE. Essa linhagem clonal estava concentrada nos frigoríficos I e III, os quais recebiam animais de algumas granjas geograficamente próximas, o que pode justificar o grande número de isolamentos desse clone. A similaridade genética entre linhagens isoladas de suínos provenientes de granjas próximas pode indicar uma fonte comum de infecção (OLSEN et al., 1993; LIEBANA et al., 2002), que pode ser relacionada à circulação de pessoas, roedores, pássaros entre outros veículos de transmissão. Ao lado disso, a elevada sobrevivência desse sorovar no ambiente deve ser considerada, como foi demonstrado por SANDVANG et al. (2000) que encontraram numa granja a persistência do mesmo clone de *S. Typhimurium* após 20 meses do primeiro isolamento.

Da mesma forma, a identificação dos isolados de *S. Typhimurium* provenientes de embutidos de carne suína demonstrou uma possível contaminação cruzada, uma vez que o fagotipo DT193 com o mesmo perfil de PFGE, encontrado no embutido, também estava presente em amostras de tonsila colhidas ao abate.

Mesmo dentro da linhagem clonal predominante nos frigoríficos I e III, observaram-se diferentes perfis de sensibilidade a antimicrobianos, sugerindo que estes isolados proximamente relacionados, podem ter adquirido diferentes genes de resistência. Neste estudo, não foi encontrada uma relação da resistência com o fagotipo ou genotipo, corroborando a hipótese de que a determinação do perfil de resistência a antimicrobianos é mais indicada no monitoramento da pressão de seleção a que as linhagens bacterianas estão

sendo submetidas no ambiente da granja, do que como uma ferramenta de estudo epidemiológico.

Nossas investigações claramente demonstraram que a caracterização de isolados de *S. Typhimurium* por fagotipificação pode fornecer uma valiosa informação epidemiológica e que a PFGE será uma ferramenta essencial para a caracterização dessas linhagens em estudos epidemiológicos futuros.

### **Conclusão**

A combinação da fagotipificação e do perfil de macro-restrição permitiu a discriminação de linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. Foi possível identificar uma linhagem clonal predominante nas amostras colhidas nessa região entre os anos de 1999 e 2001, indicando que podem haver pontos comuns na cadeia epidemiológica.

### **Referências Bibliográficas**

ANDERSON, E.S.; WARD, L.R.; SAXE, M.J.; DE SA, J.D. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella typhimurium*. **Journal Hygiene** (London) 78, 297-300. 1977

ANG-KÜÇÜKER, M.; TOLUN, V.; HELMUTH, R.; RABSCH, W.; BÜYÜKBABA-BORAL, O.; TÖRÜMKÜNEY-AKBULUT, D.; SUSEVER, S.; ANG, Ö. Phage types, antibiotic susceptibilities and plasmid profiles of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains isolated in Istanbul, Turkey. **Clinical Microbiology Infection** 6, 593-599, 2000.

BANDEIRA, R M. **Presença de *Salmonella* sp. em suínos ao abate e em cortes de pernil processados em frigoríficos do Rio Grande do Sul.** 2003. 94f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

BENDER, J. B.; HEDBERG, C.W.; BOXRUD, D.J.; BESSER, J.M.; WICKLUND, J.H.; SMITH, K.E.; OSTERHOLM, M.T. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **New England. Journal Medical**, v.344,n.3, p.189-195, 2001.

BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, p. 80-84, 2004.

BESSA, M. C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.** 2006. Tese de Doutorado – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BOTTELDOORN, N.; HERMAN, L.; RIJSENS, N.; HEYNDRICKX, M. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouses. **Applied and Environmental microbiology**, v.70, n.9, p.5305-5314, 2004.

CASTAGNA, S.M.F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* ao abate e contaminação de embutidos frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 141-147, 2004.

DALY, M.; FANNING, S. Characterization and Chromosomal Mapping of Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.11, p.4842-4848, 2000.

GEBREYES, W.A.; ALTIER, C. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. **Journal Clinical Microbiology**, 40, 2813-22. 2002.

GEBREYES, W. A.; DAVIES, P.R.; TURKSON,PK; MORROW,W.E.M.; FUNK,J.A.;ALTIER,C.; THAKUR,S. Characterization of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. **Journal of Food Protection**, v.67, n.4, p.698-705, 2004.

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. 114f. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias- Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

GUERRA, B.; LACONCHA, I.; SOTO, S.M.; ANGELES, M.; MENDOZA, C Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-]

organisms causing human salmonellosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.190, n.2, p.341-347. 2000.

HELMS, M.S., ETHELBERG, K. Mølbak. An international survey of multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium infections in humans, with particular reference to DT104, 1992-2001. **Emergent Infection Disease**, v.11, 859-867, 2005.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26,n.11, p.2465-2466, 1988.

HUDSON, C.R.; GARCIA, M.; GAST, R. K.; MAURER, J. J. Determination of close genetic relatedness of the major *Salmonella enteritidis* phage types by pulsed-field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several *Salmonella* virulence genes. **Avian Diseases**, v.45, p.875-886, 2001.

KARIUKI, S.; OUNDO, J. O; MUYODI, J; LOWE, B; THRELFALL, E J; HARD, C. A.Genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotypes typhimurium from two regions of Kenia. **Immunology and Medical Microbiology**, v.29, p.9-13, 2000.

KAUFFMANN, F. Über die serologische and kulturelle Varianten der Paratyphus D- und Mäusetyphus-Bacillen. **Z Hygiene**, **116**, 368-384, 1934.

LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I; GARAIZAR, J. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food microbiology**, v.40, p.27-34, 1998.

LETELLIER, A.; MESSIER, S.; QUESSY, S. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.62,n.1, p.22-25, 1999.

LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; CLOUTING, C.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; LINDSAY, E.; THRELFALL, E. J.; McDOWELL, W. J.; DAVIES R.H. 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, 2002.

LIEBISCH, B; SCHWARZ, S. Evaluation and comparison of molecular techniques for epidemiological typing of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *dublin*. **Journal Clinical Microbiology**, v.34, p.641-646, 1996.

LIU, S.L.; HESSEL, A.; SANDERSON, K.E.; The *XbaI-BlnI-Ceu* genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2 determined by double digestion, end labeling and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal. Bacteriology** 175, p.4104-4120, 1993.

MAGUIRE, H.C.F.; CODD, A.A.; MACKAY, V.E.; ROWE, B.; MITCHEL, E.A. A large outbreak of human salmonellosis traced to a local pig farm. **Epidemiology and Infection**, v.110, p.239-246, 1993.

MASLOW, J.; MULLIGAN, M.E. Epidemiologic typing systems. **Infection. Control Hospital. Epidemiology**, v.17,n.9, p.595-604, 1996.

MILLEMANN, Y., LESAGE, M.C., DANCLA, E.C. AND LAFONT, J.P Value of plasmid profiling ribotyping and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. **Journal Clinical Microbiology** 33, 173-179, 1995.

MURASE, T.; OKITSU, T.; SUZUKI, R.; MOROZUMI, H.; MATSUSHIMA, A.; NAKAMURA, A.; YAMAI S. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an epidemiology tool for *Salmonella* infections. **Microbiology Immunology**, v.39, p.673-676, 1995.

MURPHY, T.M.; McNAMARA, E.; HILL, M.; ROONEY, N.; BARRY, J.; O'CONNELL A.; O'LOUGHLIN J., McFADDYEN S. Epidemiological studies of human and animal *Salmonella typhimurium* DT104 and DT104b isolates in Ireland. **Epidemiology Infection**, v.126, p.3-9, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS), (2002) Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals – Second edition: Approved standard M31-A2, NCCLS, Wayne, PA, USA.

NAVERBY B., PEDERSEN K., DIETZ H., MADSEN M. Comparison of Danish isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis /PT9a and PT11 from Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and humans by plasmid profiling and pulse-field gel electrophoresis. **Journal of clinical microbiology**, v.38, n.10, p.3631-3635, 2000.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, S.D. **Detecção de *Salmonella* sp. E Caracterização de isolados de *Salmonella enteritidis* pela presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e por rep-PCR fingerprinting.** 2003. 141f. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias- Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



OLSEN, J.E., BROWN, D.J., SKOV, M.N. AND CHRISTENSEN, J.P Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis: applications in investigations of salmonellosis among livestock. **The Veterinary Quarterly**, v.15, n.4, p.125-135, 1993.

PALMER S. et al. The role of outbreaks in developing food safety policy: population based surveillance of salmonella outbreaks in Wales 1986-1998. **Epiemiology Infection**, v.125, 2000. p.467-472.

PONTELLO, M.; SODANO, L.; NASTASI, A.; MAMMINA, C.; ASTUTI, M.; DOMENICHINI, M.; BELLUZZI, G.; SOCCINI, E.; SILVESTRI, M.G.; GATTI, M.; GEROSA, E.; MONTAGNA A. A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy. **Epidemiology infection**, v.120, p.209-214, 1998.

SANDVANG, D.; JENSEN, L. B.; BAGGESEN, D. L.; BALODA, S.B. Persistence of a *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clone in Danish pig production units and farmhouse environment studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **FEMS Microbiology Letters**, v.187, p.21-25, 2000.

SAUER, S., PUDICH, U., WERMTER, R., GERICKE, B., PRAGER, R., FRUTH, A., BROCKHAUS, E., TSCHÄPE, H. AND RABSCH, W. An outbreak caused by *S. Typhimurium* DT177, B<sub>Ta</sub> in Bavaria characterized by an unusual antibiotic resistance and plasmid profile. In 4<sup>th</sup> International Symposium on Epidemiology and Control of *Salmonella* and other foodborne pathogens in pork, Leipzig, Germany, pp.361-363, 2001.

SCHWARZ, S.; LIEBISCH, B. Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain. **Zoosaloral H. Lett. Appl. Microbial**, v.19, p.469-472, 1994.

TENOVER F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strains typing. **Journal of clinical Microbiology**, v.33,n.9, 1995. p.2233-2239.

WEGENER, H. C.; BAGGESEN, D.L.; GAARSLEV K. *Salmonella typhimurium* phage types from human salmonellosis in Denmark 1988-1993. **APMIS**, v.102, p.521-525, 1994.

WEIGEL, R M; QIAO B; BARBER D A; TEFEREDEGNE B; KOCHERGINSKAYA S. Identification of patterns of transmission of *Salmonella* within swine production systems using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and repetitive sequence polymerase chain reaction (REP-PCR): a quantitative analysis. **Berliner- Muenchener Tieraerztliche Wochenschrift**, v., p. 566-573, 2001.

Tabela 1: Caracterização por fagotipificação, presença de antígeno O5 e perfil de resistência a antimicrobianos de 40 linhagens de *Salmonella* Typhimurium provenientes de dois matadouros-frigoríficos de suínos do Rio Grande do Sul, no período de 2000 a 2001.

N	Granja	Fonte	Fagotipo (DT)	var. Copenhagen	Perfil de sensibilidade
11	9,10,11	LS/T	RDNC1(6),RDNC2(4),126A(1)	11	SmSuTe
5	11,12	LS/T	RDNC1(4),177(1)	4	SmTe
4	9,12,14	LS/T	177(3),RDNC1(1)	2	NaSmTe
3	11,15	LS/T	177,193,RDNC1	1	NaCmSmTe
2	4,11	LM/T	UT/177	0	GmNaSmSuTe
2	4,15	F/LS	177	0	Te
2	9,10,	LS	RDNC1	2	SmStSuTe
2	-	E	193	1	CmNaSmStSuTe
1	-	E	193	1	CmNaSmStSuTeTo
1	-	E	177	0	ApNaSmStSuTe
1	-	E	193	0	ApCmNaSmTe
1	-	E	UT	-	Sensível
1	35	LM	194	1	SuTe
1	11	T	177	1	CmSmTe
1	8	T	177	0	CmNaTe
1	13	LS	RDNC1	1	Sm
1	15	LS	177	0	SmTeTo

E= embutido; F= fezes; LM= linfonodo mesentérico; LS= linfonodo submandibular; T= tonsila. UT: Não tipificável

Tabela 2: Tipificação molecular de *Salmonella* Typhimurium por fagotipificação e PFGE de 97 isolados de suínos levados ao abate no Rio Grande do Sul no período de 1999 a 2001.

N	Frigorífico	Granjas	DT	Padrões Macro-restrição
				<i>Xba</i> I
47	I,II,III	4,5,8,9,11,12,14,15,16,17,18,19,20 21,22,23,24,25,26,27,28,29,33,35	177	A(32),D(1),E(3),F(7),I(1),K(2),H(1)
20	III	9,10,11,12,13,15	RDNC'1	A(11),C(1),E(1),G(2),I(4),K(1)
8	II,III	6,35,36,37,38	194	A(6),F(2)
5	III	9	RDNC'2	A(5)
5	III	11	193	A(4),B(1)
4	I,II,III	4,16,35	UT	A(4)
2	II,III	1,35	192	A(2)
1	III	7	68*	L(1)
1	III	2	99*	L(1)
1	III	3	8	L(1)
1	II	34	18*	J(1)
1	III	5	RDNC'4	D(1)
1	III	9	126A	I(1)
<b>Total</b>	<b>97</b>	<b>35</b>	<b>12</b>	<b>12</b>

\*: Linhagens que apresentaram a região *spvR*

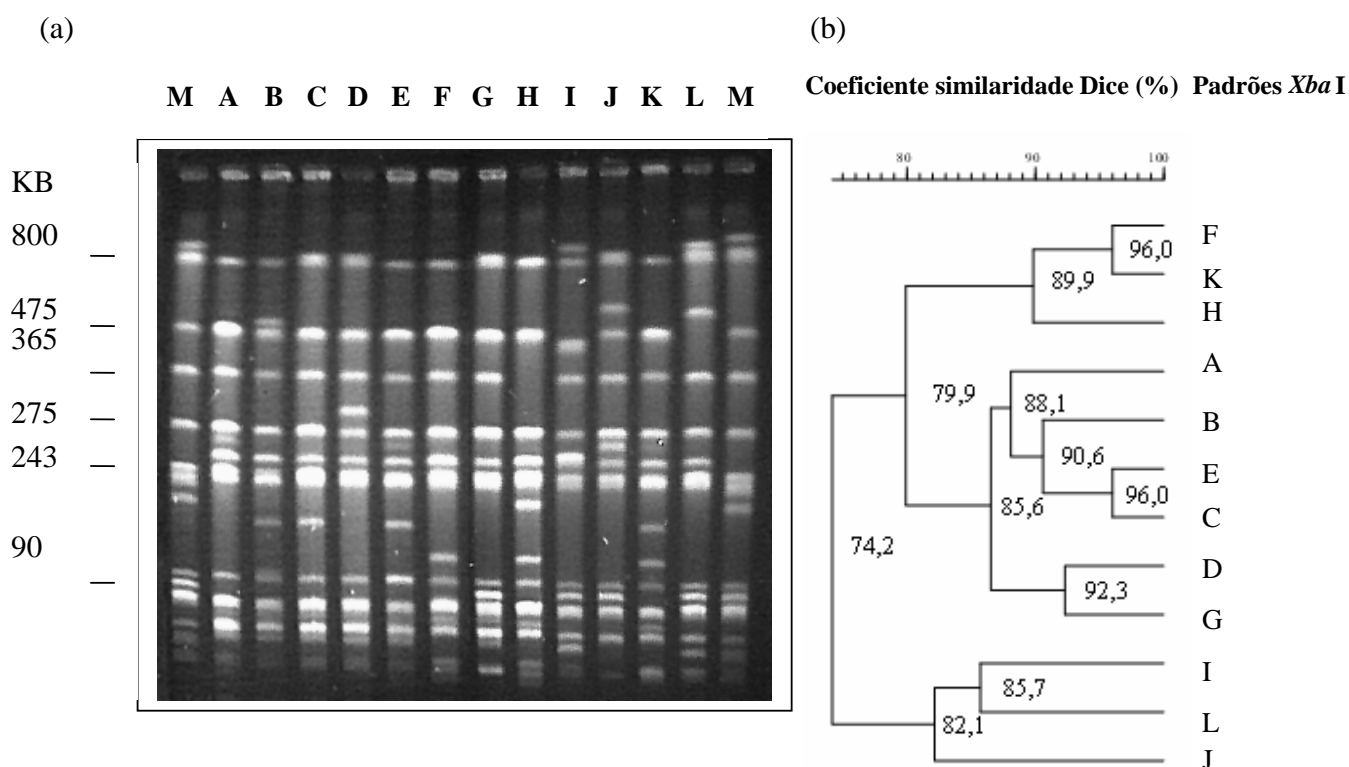


Figura 1: Padrões de eletroforese em campo pulsado (PFGE) do DNA genômico de 97 *Salmonella* Typhimurium obtidos com a enzima de restrição *Xba*I. Linha 1 e 14 DNA de *Salmonella* Typhimurium LT2(marcador); linhas de 2 a 13 correspondem aos padrões diferentes na tabela 2 (a). Dendograma mostrando a relação entre os padrões. A análise da similaridade foi realizada usando o coeficiente de Dice e agrupadas por UPGMA (b)

**CAPÍTULO 5: SENSIBILIDADE E RESISTÊNCIA DE AMOSTRAS DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM ISOLADAS DE SUÍNOS ABATIDOS NO RIO GRANDE DO SUL/BRASIL, FRENTE AOS DESINFETANTES QUÍMICOS QUATERNÁRIO DE AMÔNIO E IODOFOR.**

SUBMETIDO: CIÊNCIA RURAL, 2006

**Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil, frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform.**

Sensitivity and resistance of samples of *Salmonella* Typhimurium isolated in slaughter swines in the state Rio Grande do Sul/Brazil, front to disinfectants quaternary ammonium and iodophor.

Luciane Martins Borowsky<sup>1</sup>; Marjo Cadó Bessa<sup>2</sup>; Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso<sup>3</sup>; César Augusto Marchionatti Avancini<sup>4</sup>

1. Médica Veterinária, Mestre, Doutoranda no Programa de Pós-graduação de Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Farmacêutica, Mestre, Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

3. Médica Veterinária, Doutora, Professora Titular no Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

4. Médico Veterinário, Cientista Social, Doutor, Professor Adjunto, Depto. de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, Av. Bento Gonçalves 9.090 – Porto Alegre/RS/Brasil – CEP. 91.540-000, E-mail: [cesar.avancini@ufrgs.br](mailto:cesar.avancini@ufrgs.br)

**RESUMO**

Na prevenção da ocorrência ou na interrupção da evolução de enfermidades infecto-transmissíveis comuns aos animais e aos seres humanos, como é o caso da salmonelose, o uso de um desinfetante capaz de agir sobre o agente causal quando em vida livre, no ambiente, exerce grande importância. No entanto, a resistência microbiana, intrínseca ou adquirida, pode apresentar-se como um limitante no uso deste instrumento sanitário. Objetivando monitorar a sensibilidade da *Salmonella* Typhimurium, 96 amostras isoladas de suínos abatidos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, foram confrontadas com dois compostos químicos desinfetantes (origem comercial) de uso frequente em ambientes de

produção animal e nos de transformação de seus subprodutos: um quaternário de amônio e o iodofor. Foram usadas as concentrações indicadas pelo fabricante, e uma menor para simular possível situação de sub-concentração. O método de verificação foi o de diluição através do teste de suspensão, observando a inativação bacteriana nos tempos de contato 5, 15, 30 e 60 minutos. Como resultados obtidos, todas amostras foram inativadas quando utilizado o composto quaternário de amônio, em ambas concentrações. Frente ao iodofor, 4 (quatro) amostras mostraram-se resistentes a este composto na concentração indicada e 59 frente a sub-concentração. Conclui-se ser necessário, seja para a eleição ou monitoramento da eficácia, o confronto dos desinfetantes/antissépticos com bactérias presentes nos ambientes específicos de produção animal, ou mesmo nos de transformação de seus subprodutos.

Palavras-chave: *Salmonella* Typhimurium, quaternário de amônio, iodofor, desinfetante, Medicina Veterinária Preventiva, sanidade animal, suinocultura.

## **ABSTRACT**

In prevention of occurrence of evolution of infectious-transmissible diseases common to animals and human beings, such as salmonellosis, the use of a disinfectant cleaner able to act on the causal agent, has great importance. However, microbial resistance can presents itself as a limit in the use of this sanitary instrument. With the aim of monitoring the sensitivity of the *Salmonella* Typhimurium, 96 isolated swine samples, slaughtered in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, were subjected to two chemical disinfectants (commercial origin) commonly used in animal production: quaternary ammonium and iodophor. The concentrations used were those recommended by the manufacturer and a



lower concentration in order to simulate a possible situation of sub-concentration. Dilution suspension test was employed as investigation method, observing the bacterial inactivation for times of contact 5, 15, 30 and 60 minutes. The results revealed that all samples were inactivated when the quaternary ammonium was used in both concentrations. Four samples revealed resistant to this chemical compost under the recommended concentration and 59 samples under the sub-concentration. In conclusion is necessary to confront the disinfectants/antiseptic with bacteria found in specific environments of animal production or by-products transformation environments in order to choose or monitor the effectiveness of these products.

Key words: *Salmonella* Typhimurium, quaternary ammonium, iodophor, preventive Veterinary Medicine, animal health, swine breeding.

## INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Salmonella* têm ampla distribuição mundial, são correntes nos ambientes de produção animal constituindo-se também em potencial problema sanitário para a saúde pública. Alguns sorovares de *Salmonella* são adaptados a espécie de hospedeiro específico como o Typhi para humanos, o Choleraesuis para suínos e o Dublin para bovinos (SCHWARTZ, 2000), enquanto outros como o Typhimurium, o Anatum e o Newport, entre outros, afetam um grande número de hospedeiros, desempenhando importante papel na disseminação da infecção entre as diferentes espécies (HIRSH, 1990). A transmissão de *Salmonella* sp. ao homem ocorre principalmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, o que pode resultar em toxinfecções alimentares,

sendo considerada uma das mais importantes causas de doença de origem alimentar entre humanos (EKPERIGIN & NAGARAJA, 1998).

Nas toxinfecções alimentares registradas, tanto no Brasil quanto no exterior, os sorovares de *Salmonella* isolados com maior frequência têm sido o Enteritidis e o Typhimurium (ESPER et al., 1998; JAKABI et al., 1999; VAN DER WOLF et al., 2001).

Entre as principais medidas de prevenção ou de controle aplicáveis em programa sanitário para esta enfermidade, encontram-se a limpeza e a desinfecção (FEDORKA-GRAY et al., 1994; BORCH et al., 1996; BLAHA, 1996).

SCHLIESSER & STRAUCH (apud Wiest, 1984) conceituam a desinfecção (superfícies inanimadas) e antissepsia (superfícies de tecidos vivos) como o controle ou a eliminação dirigida de microrganismos considerados indesejáveis em situações-problema específicas, pela atuação em sua estrutura ou em seu metabolismo, independente de seu estado funcional, visando prejudicar a transmissão desses microrganismos e/ou reduzir a sua dose infectante.

Diversos compostos químicos ativos desinfetantes estão disponíveis no mercado, sendo os mais utilizados, na suinocultura, os compostos de amônia quaternária, glutaraldeído, iodóforo e hipoclorito (KICH et al., 2004).

O Código Zoosanitário Internacional, ao tratar sobre o tema medidas de higiene e segurança sanitária na produção animal, alerta sobre a existência de poucos desinfetantes universais, bem como indica a necessidade de haver controle sobre a atividade biocida dos produtos existentes. Variáveis como a amostra do microrganismo de interesse e a concentração do produto recomendada pelo fabricante, devem ser submetidas à avaliação para comprovar sua eficácia (DOMINGUES & LANGONI, 2001).

Nos últimos anos, consideráveis avanços têm sido realizados no entendimento da resposta de diferentes microrganismos aos agentes antimicrobianos. A resistência pode ser uma característica própria do microrganismo (intrínseca) ou adquirida por mutação, mediada por plasmídios ou transposons. A resistência intrínseca tem sido demonstrada por bactérias Gram negativas, esporuladas, micobactérias e, sob certas circunstâncias, estafilococos. A resistência adquirida ou mediada por plasmídios tem sido associada aos compostos mercuriais e outros sais metálicos. Mais recentemente, resistência adquirida a certos tipos de biocidas (desinfetantes) tem sido observada, notadamente pelos estafilococos (McDONNELL & RUSSEL, 1999).

CHAPMANN (1998) alerta que a experiência com resistência a antibióticos e a biocidas indicam que não há agente químico antimicrobiano que não possa, eventualmente, induzir resistência nos microrganismos. E que essa observação, acoplada com a do decréscimo da taxa de oferecimento de novos grupos químicos biocidas ativos, aumentam a necessidade de saber manejar o risco do desenvolvimento de resistências bem como responder rapidamente à sua eventual ocorrência.

A resistência a antimicrobianos antibióticos tem sido exaustivamente estudada. No entanto, a resistência bacteriana frente a produtos desinfetantes, mesmo sendo uma preocupação crescente, é pouco compreendida (RUSSEL, 1998; McDONNELL & RUSSEL, 1999). Nesse sentido, destaca-se a quase inexistência de investigação científica que avalie continuamente a eficácia antimicrobiana de desinfetantes utilizados em saúde e produção animal. Estas, quando existentes, na maior parte das vezes, são resultado de estudos confrontando os produtos com amostras padrões internacionais.

Os compostos quaternário de amônio, entre os quais encontra-se o cloreto de benzalcônio, são detergentes catiônicos sintéticos que possuem atividade antimicrobiana. Possuem boa estabilidade, solubilidade em água e toxicidade relativamente baixa (PELCZAR; REID & CHAIN, 1980). A ação bactericida é atribuída à inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, desnaturação de proteínas celulares e ruptura da membrana celular (ROMÃO, 1996).

Os iodóforos são compostos formados por agente químico antimicrobiano iodo com agentes tenso-ativos, que funcionam, ao mesmo tempo, como carreadores e solventes desse elemento. Apresentam as características bactericidas rápidas e irreversíveis do iodo, tendo como vantagens gerais adicionais não mancharem as superfícies e não serem irritantes de mucosa (PELCZAR; REID & CHAIN, 1980). O exato mecanismo através do qual o iodo age como microbicida não está esclarecido, mas assume-se como sendo principalmente provocada pela alteração na síntese protéica devido oxidação do grupo S-H da cisteína (GOTTARDI, 1991).

Medidas de higiene ambiental são indispensáveis para programas sanitários de biossegurança frente a *Salmonella* sp. Uma vez que o uso de antimicrobiano/biocida de ambiente é procedimento crítico em um protocolo de controle de *Salmonella*, visando orientar sua escolha em relação a esse agente causal, em suinocultura, este estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade e/ou resistência de 96 (noventa e seis) amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil, frente dois compostos químicos desinfetantes, um quaternário de amônio e o iodofor.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Amostras bacterianas**

As 96 amostras de *Salmonella* Typhimurium utilizadas no presente estudo estão armazenadas no Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). As amostras foram isoladas, no período de 1999 à 2001, de fezes, linfonodos mesentéricos, linfonodos submandibulares, tonsilas e embutidos de suínos abatidos em matadouros/frigoríficos no Rio Grande do Sul, Brasil. Quanto à origem das amostras, 48 delas foram isoladas de animais diferentes. As demais 48 foram isoladas de 24 animais, duas de cada um, em dois locais diferentes em cada animal. Consideraram-se as amostras dos mesmos animais como sendo diferentes entre si porque, na avaliação de sensibilidade e resistência a antibióticos, as isoladas pareadas em 13 animais apresentaram perfil antimicrobiano antibiótico e/ou fagotipos diferentes. As 22 amostras restantes foram inseridas no trabalho com a possibilidade de diferenciarem-se quanto ao perfil antimicrobiano desinfetante.

As amostras foram mantidas congeladas ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) em caldo de infusão cérebro e coração (BHI – Merck®) e glicerol. Para a reativação bacteriana, pequena quantidade foi retirada através de alça bacteriológica, semeada em Ágar Tripsona Soja (Merck®) e incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas. Para os testes, uma colônia foi retirada da placa semeada e colocada em 5 mL de caldo BHI, incubado por 18-24 horas, tornando-se a “cultura-mãe”.

### **Desinfetantes**

O composto quaternário de amônio foi obtido de um produto comercial contendo a seguinte composição: 15g cloreto de benzalcônio e veículo 100mL. A concentração recomendada é de 0,6mg/L, tendo sido adotada como sub-concentração de uso 0,3mg/L.

O iodofor foi obtido de uma composição comercial contendo: 2,5g de iodo; 2,75g de ácido fosfórico e veículo 100mL. A concentração recomendada é de 0,1mg/L, tendo sido adotada como sub-concentração de uso 0,05mg/L. A diluição dos compostos químicos foi feita em água destilada estéril.

### **Teste de eficácia de desinfetante**

O método foi o de diluição, com teste de suspensão, descrito pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 1993). Tubos de ensaio contendo 10mL do desinfetante, com a concentração recomendada e a sub-concentração, receberam 0,1mL da “cultura-mãe” (que continha aproximadamente  $1,4 \times 10^9$ UFC/mL). Através de alça bacteriológica, após os tempos de contato 5, 15, 30 e 60 minutos, uma alíquota foi retirada e colocada em tubos de ensaio contendo 1mL do meio de cultura BHI. Esses tubos foram agitados, incubados a 37°C e as observações feitas nos tempos 24, 48, 72 e 96 horas.

A leitura destes tubos indicava os resultados: não turvação, considerado bactéria inativa; turvação, considerado bactéria ativa.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Como pode ser observado na tabela 1, quando confrontadas com o desinfetante quaternário de amônio, nas duas concentrações usadas, as 96 (100%) amostras de *Salmonella* foram sensíveis e inativadas. Quando confrontadas com o iodofor, na concentração recomendada foram inativadas 95,8% das amostras e, em sub-concentração, 38,5% delas.

Na tabela 2 podem ser observados os resultados da confrontação das amostras com os desinfetantes, levando em consideração os tempos de contato. Cem por cento das

amostras foram inativadas pelo quaternário de amônio, nas duas concentrações usadas, já nos 5 minutos de contato.

Confrontadas pelo composto iodofor, na concentração recomendada foi necessário tempo de contato de 60 minutos para inativar 95,8% das amostras. Setenta e oito amostras (81,2%) foram inativadas já aos 5 minutos de contato. Onze amostras (11,4%) foram inativadas aos 15 minutos de contato, 3 amostras (3,1%) aos 30 minutos de contato. Quatro (4,2%) amostras foram resistentes durante todos os tempos observados.

Quando o desinfetante iodofor foi utilizado como sub-concentração, em relação à recomendada pelo fabricante, mesmo com 60 minutos de tempo de contato, 59 (61,4%) amostras foram resistentes. Quanto à sensibilidade, aos 5 minutos de contato 27 amostras (28,1%) foram inativadas. Aos 15 minutos 7 (sete) amostras (7,3%) e aos 30 minutos 3 (3,1%), estavam inativas.

Das 22 amostras pareadas isoladas de 11 animais e ainda não diferenciadas, apenas 4 (quatro) não apresentaram diferença de comportamento quanto à alguma variável testada (grupo químico, concentração e tempo de contato). Essa observação evidencia a possibilidade que o perfil antimicrobiano desinfetante seja um instrumento para diferenciar amostras bacterianas.

Estudo semelhante de verificação da sensibilidade e resistência a antimicrobianos foi realizado por CARDOSO (2000), investigando a eficiência de desinfetantes frente a 80 amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frangos no estado do Rio Grande do Sul. Usando também a técnica de suspensão, diferente do presente experimento porque realizado na presença de matéria orgânica e tempo de contato de até 20 minutos, os resultados obtidos com os compostos químicos comerciais iodofor e quaternário de amônio

foram parcialmente divergentes dos que agora encontrou-se, para as amostras de *Salmonella* Typhimurium. Frente ao iodoform, com 20 minutos de contato, 4 (quatro) das 80 amostras de *Salmonella* Enteritidis foram resistentes. Já, frente ao quaternário de amônio, no mesmo tempo de contato, 73 delas foram resistentes.

Deve-se estar alerta para possíveis equívocos em conclusões obtidas pela comparação entre observações e experimentos, quando estas pesquisas usam, por exemplo métodos, técnicas e testes, microrganismos ou procedimentos diferentes usados nessa pesquisa. Por outro lado, essas comparações, buscando similaridades ou antagonismos, podem ser bons instrumentos para melhor interpretar resultados.

Em investigação realizada por SANDER et al. (2002), 17 amostras bacterianas dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Escherichia* e *Pasteurella*, isoladas em ambiente de avicultura, foram confrontadas com três grupos de desinfetantes: compostos fenólicos, quaternário de amônio e peróxido de hidrogênio. No caso da *Salmonella* sp., os desinfetantes do grupo dos fenóis inibiu a maioria das amostras enquanto o grupo do quaternário de amônio foi incapaz de promover a inativação das mesmas amostras, o que difere do resultado encontrado nesse estudo, na qual o desinfetante com base quaternário de amônio mostrou ser ativo.

KICH et al. (2004) avaliaram, em duas etapas experimentais, com teste de micropipetagem em placa, a atividade antibacteriana de seis desinfetantes comerciais, frente amostras de *Salmonella* Typhimurium também isoladas de suínos. Há dificuldade de comparação dos resultados, posto que, foi considerada sensível a amostra que apresentou redução de 4 (quatro) logaritmos em relação às unidades formadoras de colônia iniciais. De qualquer maneira, pode-se perceber semelhança parcial com os resultados obtidos na



investigação que foi apresentada neste trabalho. Esses autores observaram na primeira etapa experimental, frente a uma única amostra de *Salmonella* Typhimurium e tempo de contato de 15 minutos, que ela foi sensível ao composto quaternária de amônio e iodóforo. No entanto, diferente dos resultados obtidos no presente estudo, pois na segunda etapa de seu experimento, em único tempo de contato de 5 minutos, os autores citados indicam terem observado resistência das 11 amostras confrontadas com a quaternária de amônio e o iodóforo.

Em trabalho realizado por WILLINGHAN et al (1996), bactérias isoladas de incubadoras de ovos (câmaras de eclosão) tiveram sua resistência testada frente preparações comerciais desinfetantes de quaternário de amônio, fenol e glutaraldeído. As bactérias foram expostas ao desinfetante nas diluições recomendadas pelos fabricantes, por tempos de contato de 5, 10 e 15 minutos. Aproximadamente 8% das isoladas de duas, das três incubadoras, foram resistentes as concentrações recomendadas pelos fabricantes e, em alguns casos, até acima das concentrações e tempo de exposição. Semelhante a nossa investigação, quando usado o desinfetante quaternário de amônio, não houve indicação de resistência do gênero *Samonella*.

## CONCLUSÕES

Observou-se que as 96 amostras de *Salmonella* Typhimurium testadas apresentaram diferente sensibilidade (inativação bacteriana), tendo esta variado com o grupo químico desinfetante confrontado, com o tempo de contato e com a concentração usada.

Todas as amostras de *Salmonella* Typhimurium foram sensíveis ao produto comercial tendo como composto químico ativo o quaternário de amônio (cloreto de

benzalcônio), independente do tempo de contato ou da concentração, seja na recomendada pelo fabricante quanto na sub-concentração de uso.

Frente ao produto comercial cujo composto químico ativo é o iodofor, 4 (quatro) amostras apresentaram resistência frente a concentração recomendada pelo fabricante, mesmo com tempo de contato de 60 minutos, e 59 foram resistentes na sub-concentração de uso.

Os resultados obtidos nesta pesquisa enfatizam a orientação de que para a eleição do grupo químico desinfetante quaternário de amônio (cloreto de benzalcônio), ou o iodofor, frente ao microrganismo *Salmonella* Typhimurium, deve-se levar em conta o monitoramento da sensibilidade/resistência de amostras isoladas para cada ambiente de saúde, de produção animal ou mesmo nos de beneficiamento de seus sub-produtos.

## REFERÊNCIAS

BLAHA, T. The impact of *Salmonella* on the swine industry. In: SWINE CONFERENCE, 1996, Nebraska. **Proceedings...**Nebraska, School University of the Nebraska, 1996. p. 1-20.

BORCH, E.et al. Hazard identification in swine slaughter with respect to food borne bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v.30, p.9-25, 1996.

BRASIL, Portaria nº 101, de 17 de agosto de 1993. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos. **Diário Oficial** [Da República Federativa do Brasil], Brasília, v.n.p. 11937-11945, 17 de agosto de 1993, Seção I, 1993.

CHAPMANN, J. S. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, p. 241-245, 1998.

CARDOSO, M.O. **Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos e eficiência de desinfetantes em amostras de *Salmonella enteritidis* isoladas de carcaças de frangos no estado do Rio Grande do Sul.** 2000. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DOMINGUEZ, P. F.; LANGONI, H. **Manejo sanitário animal.** Rio de Janeiro : EPUB, 2001,p. 210.

EKPERIGIN H.E.; NAGARAJA K. V. *Salmonella*. **Microbiology Food Borne Pathoges**,v. 14, p. 17-29, 1998.

ESPER M. R. N. R. et al. *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 57, p. 45-50, 1998.

FEDORKA-GRAY, P. I. et al . Transmission of *Salmonella* Typhimurium to swine. **Veterinary Microbiology** ,v. 41, p. 333-348, 1994.

GOTTARDI, W. Iodine and iodine compounds. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation.** 4 ed. Philadelphia/London : Lea & Fabiger, 1991. p. 152-166.

HIRSH, D.C. *Salmonella*. In: BIBERSTEIN, D.V.M.; ZEE, Y.C. **Review of veterinary microbiology.** Boston: Blackwell Scientific, p. 110-115, 1990.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp.,ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p. 47-51, 1999.

KICH, J.D. et al. Evaluation of the antibacterial activity of six commercial disinfectants against *Salmonella* Typhimurium strains isolated from swine. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 1, p. 33-39, 2004.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147 –179, 1999.

PELCZAR, M.; REID, R. e CHAN, E.C.S. **Microbiologia**. São Paulo : McGraw-Hill do Brasil, 1980. Volume I.

ROMÃO, C.M.C.A. Desinfecção e esterilização química. In: TEIXEIRA, P. e VALLE, S. (org.). **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro : FIOCRUZ, 1996. p. 133-162.

RUSSEL, A.D. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. **Journal of hospital infection**, v. 43 (suplemnt), p. S57 – S68, 1998.

SANDER J.E. et al. Investigation of resistance of bacteria from comercial poultry sources to comercial disinfectants. **Avian Disease**, v. 46, p.997-1000, 2002.

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, B. E. et al. **Diseases of swine**. 8. Ames, Iowa, Iowa State University 2000, Cap.39, p. 535-551.

VAN DER WOLF P., J. et al. *Salmonella* soroprevalence at the population and herd level in pigs in the netherlands. **Veterinary Microbiology**, v. 80, p. 171-184, 2001.

WIEST, J.M. Desinfecção e desinfetantes. In: GUERREIRO, M. et al. **Bacteriologia especial: com interesse em saúde pública e saúde animal**. Porto Alegre: Sulina, 1984. p.51-66.

WILLINGHAN, E. M. et al. Investigation of bacterial resistance to hatchery disinfectants. **Avian Disease**, v. 40, n. 3, p. 510-515, 1996.

Tabela 1: Número de amostras de *Salmonella* Typhimurium sensíveis (inativadas) frente aos grupos químicos desinfetantes quaternário de amônio e iodofofor, em duas concentrações de uso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

		Concentração	Concentração
Ação		recomendada	sub-concentração
Quaternário de amônio	inativação	96	96
	sem inativação	-	-
Iodofofor	inativação	92	37
	sem inativação	4	59

Tabela 2: Número de amostras de *Salmonella* Typhimurium sensíveis (inativadas), por tempo de contato, frente duas concentrações dos grupos químicos desinfetantes quaternário de amônio e iodoform - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

tempo contato	Quaternário de amônio		Iodoform	
	CR	SC	CR	SC
5	96	96	78	27
15	-	-	11	7
30	-	-	3	3
60	-	-	-	-
resistentes	-	-	4	59

CR= concentração recomendada; SC= sub-concentração;

## **CAPÍTULO 6: DISCUSSÃO GERAL**

## DISCUSSÃO GERAL

A qualidade microbiológica dos alimentos ingeridos pela população é um aspecto importante a considerar na questão de saúde pública. Vários microrganismos podem ser importantes causadores de infecções quando presentes em alimentos, entre eles a *Salmonella* sp. Esta, por sua vez, é uma das mais importantes causadoras de toxinfecções alimentares.

Entre os sorovares mais frequentemente isolados em episódios de toxinfecções alimentares em humanos, no Brasil, encontram-se Enteritidis, Typhimurium, Bredeney e Tennessee (LANDGRAF, M.; GANÇALVES, J.A.; FALCÃO, D.P., 1985; CAUDURO, P.F.; MEZZANI, A.; DIAS, C.A.G., 1986; ESPER, M.R.N.R. et al., 1998; DIAS, R.S.; CARMO, L.S.; SILVA, M.C.C., 1999; JAKABI, M. et al., 1999; GEIMBA, M.P. et al., 2004).

O suíno pode tornar-se infectado com a *Salmonella* sp. desde a granja até o abate. Estes suínos poderão contaminar, através das fezes, as carcaças durante o processamento e os equipamentos utilizados durante o abate, podendo o microrganismo chegar ao produto final (LINTON, A.H., 1979; HIRSH, D.C., 1990; SOBESTIANSKY, J. et al., 1999). A *Salmonella* Typhimurium é um dos sorovares mais prevalentes em suínos e seus derivados em muitos países (SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A., 2001).

Estudos realizados no Rio Grande do Sul (BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M., 2004) constataram que o número de suínos portadores de *Salmonella* sp., alcançou níveis expressivos, representando uma fonte de contaminação para outros animais e para o produto final. Os sorovares mais frequentemente isolados nestes estudos foram Typhimurium e Bredeney.

A contaminação da carne suína e seus derivados, por este microrganismo, representa um sério risco à saúde pública e um problema para competir no mercado de exportação, que apresenta cada vez mais exigências em relação à qualidade do produto obtido sob critérios que respeitem o meio ambiente e o bem-estar animal (MOO, D. et al., 1980).



Eliminar *Salmonella* sp. de todos os suínos em uma granja é, praticamente, impossível mas uma significativa redução dos animais portadores e das perdas econômicas pode ser conseguida.

Devido à dificuldade de identificar a fonte de contaminação da *Salmonella* sp., por ser um patógeno amplamente distribuído, a implementação de sistemas de identificação são essenciais para diminuir a infecção nos suínos (PONTELLO, M. et al., 1998).

A aplicação de técnicas fenotípicas e genotípicas na cadeia produtiva de suínos pode permitir traçar a mobilidade de *Salmonella* sp., caracterizando linhagens virulentas, correlacionando-as à fonte de infecção e identificando os reservatórios naturais.

Os métodos de tipificação molecular vêm sendo usados por vários pesquisadores a fim de determinar a relação epidemiológica de linhagens de *S. Typhimurium* (KARIUKI, S. et al., 2000; SOTO, S.M. et al., 2001; YANG, S.J. et al., 2002; LING, M.L. et al., 2002). Entre elas, pode-se citar análise do perfil de plasmídeos, ribotipificação, elemento de inserção IS200, PCR de seqüências repetitivas (rep-PCR), Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) e Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) (LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S., 1996; MILLEMANN, Y. et al., 2000; SANDVANG, D. et al., 2000; TSEN, H.Y.; LIN, J.S.; HSIEN, H.Y., 2002; LAILLER, R. et al., 2002).

Sabidamente não havia informações sobre as características moleculares de isolados de *Salmonella* Typhimurium provenientes de suínos levados ao abate no Rio Grande do Sul. Para isso foi necessário aplicar métodos amplamente conhecidos para a subtipificação das linhagens de *Salmonella* isoladas da cadeia de produtiva de suínos.

O primeiro trabalho foi realizado em parceria com a Itália e Alemanha. Onde, a técnica de IS200 foi realizada no “Istituto di Igiene e Medicina Preventiva, University of Sassari”, na Itália; e a fagotipificação das amostras foi conduzida no “Robert Koch Institut, Wernigerode Branch, National Reference Center for Salmonellae and other Enterics”, na Alemanha. Este trabalho teve por objetivo tipificar, através da hibridização por IS200, fagotipificação, perfil de resistência a antimicrobianos e detecção pela PCR da região *spvR*, 65 *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium isoladas em três frigoríficos no Rio Grande do Sul provenientes de dois estudos de prevalência de *Salmonella* em suínos

levados ao abate e em embutidos tipo frescal (BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M., 2004; CASTAGNA, S.M.F. et al., 2004).

A IS200 é uma técnica muito utilizada em estudos epidemiológicos a respeito do gênero *Salmonella* (RUBINO, S. et al.; 1998; MILLEMANN, Y. et al., 2000; BEUZÓN, C.R.;CHESSA, D.;CASADESÚS, J., 2004). Entretanto, o resultado deste trabalho demonstrou um baixo poder de discriminação desta técnica. A diversidade do IS200 apenas foi encontrada em linhagens classificadas em fagotipos muito distintos das demais linhagens isoladas na mesma região (padrão B-DT99, padrão C-DT8, padrão D-DT18) e nas duas linhagens envolvidas em surtos (uma da granja de suínos e outra da carne bovina) as quais apresentaram padrão E. O padrão B apresentou o fagotipo DT99, variante Copenhagen, o qual é relatado como um fagotipo altamente adaptado a aves (RABSCH, W. et al., 2002; PASMANS, F. et al., 2003), demonstrando a possibilidade desses animais, que circulam pelas granjas, transmitirem *Salmonella* sp. aos suínos. Por outro lado a fagotipificação e o perfil de resistência a antimicrobianos mostraram-se mais discriminatórias em relação ao IS200..

O segundo trabalho propôs aplicar um método genotípico que fosse capaz de discriminar estas linhagens de *Salmonella* Typhimurium. As técnicas de escolhas foram REP-PCR e ERIC-PCR por serem técnicas utilizadas com sucesso em estudos epidemiológicos envolvendo *Salmonella* sp. isolada de suínos e serem menos onerosas que outras técnicas moleculares (WEIGEL, R.M. et al., 2001; SWANENBURG, M.; KEUZENKAMP, D.A.;SNIJDERS, J.M.A., 1998). Para este estudo foram utilizadas 57 linhagens de *Salmonella* Typhimurium, do estudo anterior, e incluídas mais 40 linhagens isoladas em 2000 e 2001. Ainda, foram incluídos isolados de *Salmonella* sp. epidemiologicamente não relacionados, envolvidos em surtos no Brasil e em outros países, com a finalidade de verificar o poder de discriminação da técnica. No entanto, as técnicas não foram capazes de discriminar as 97 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas no RS, mesmo aquelas pertencentes a fagotipos distintos. Ao lado disso a técnica não diferenciou isolados provenientes de outras regiões do Brasil e de outros países. Apenas diferentes sorovares de *Salmonella* sp. puderam ser diferenciados.

Vários estudos visando a subtipificação de *Salmonella* Typhimurium, trazem a associação das técnicas utilizadas acima com a eletroforese em campo pulsado, PFGE

(VERSALOVIC, J. et al., 1994; MILLEMAN, Y. et al., 1995; GUERRA, B. et al., 2000; SANDVANG, D. et al., 2000; BENDER, J.B., 2001). Esta técnica é considerada “padrão ouro” de tipificação molecular pelo elevado poder de discriminação que possui (OLIVE, D.M.; BEAN, P., 1999).

Através disso, o terceiro trabalho teve o objetivo de associar o perfil de resistência a antimicrobianos e a fagotipificação com a PFGE das 97 linhagens de *Salmonella* Typhimurium, técnica que haviam sido mais discriminatórias nos estudos anteriores, com a PFGE.

A técnica de PFGE junto com a fagotipificação conseguiu demonstrar uma melhor discriminação entre as linhagens isoladas em três frigoríficos no Rio Grande do Sul (APÊNDICE A).

No frigorífico I (APÊNDICE B) observou-se a presença de um único fagotipo, DT177, e um único padrão de IS200 (A) para os isolados. Por outro lado, isolados deste frigorífico mostraram diferenças no padrão de resistência a antimicrobianos e na PFGE, pois a técnica de PFGE conseguiu detectar seis padrões diferentes.

Quando um único fagotipo é dominante em um estudo, esta técnica torna-se inadequada, porque a presença desse tipo em uma amostra não representará uma informação valiosa sobre a origem da bactéria (OLSEN, J.E. et al., 1993). Para este tipo de população, com um elevado grau de clonalidade, é necessário aplicar múltiplas técnicas de tipificação para ser capaz de discriminar estes clones numa investigação epidemiológica.

O DT177 até o momento não havia sido relatado no Brasil, no entanto em outros países este fagotipo foi encontrado envolvido em surtos humanos. Em 1994, WEGENNER, H.C.; BAGGESEN, D.L.; GAARSLEV, K. encontraram um isolado quando investigaram vários surtos de salmonelose em humanos na Dinamarca; e em 2001 na Alemanha, SAUER, S. e colaboradores encontraram o DT177 envolvido em um surto em humanos causado pelo consumo de produto de origem suína. Apesar de não ser um fagotipo frequentemente encontrado, deve ser considerado de importância para a saúde da população.

No frigorífico II e III verificou-se uma maior variabilidade entre os isolados em relação ao frigorífico I (APÊNDICE B). No frigorífico II quatro fagotipos diferentes foram

observados, sendo que o fagotipo predominante foi o DT194, apesar do DT177 também ter sido encontrado. A PFGE detectou três padrões diferentes para estes isolados. Neste frigorífico encontrou-se um isolado demonstrando o padrão mais distinto dos demais (Padrão IS200, D – DT18 – Padrão PFGE, J- *spvR*+ - Su resistente).

No frigorífico III verificou-se a maior variabilidade entre as linhagens. Neste, foram encontrados onze fagotipos diferentes e nove padrões diferentes de PFGE. A diferença encontrada no perfil de IS200 correlacionou com a presença da região *spvR*, apesar de um dos isolados com o gene *spvR* apresentar o padrão A de IS200.

A maioria das 97 linhagens de *Salmonella* Typhimurium apresentou maior resistência à tetraciclina, estreptomicina e sulfonamida. Provavelmente por serem antimicrobianos amplamente utilizados na suinocultura (WEGENNER, H.K., 2003) e pelo envolvimento de elementos genéticos móveis, como os integrons, pela frequência encontrada de resistência à sulfonamida (DALY, M.; FANNING, S., 2000).

Foi observado, no frigorífico (I), multiresistência a antimicrobianos em todas as linhagens analisadas. Isso pode ser explicado pelo elevado uso de agentes antimicrobianos como promotores de crescimento, agentes profiláticos e terapêuticos na suinocultura, contribuindo para esta emergência de linhagens multiresistentes. Interessante observação foi a presença de multiresistência em isolados de linfonodos submandibulares e tonsilas, os quais vão ser ingredientes de embutidos. Este elevado número de linhagens multiresistentes em *Salmonella* Typhimurium e sua variante Copenhagen foi também observado por GEBREYES, W.A. et al. (2004). Já no frigorífico II cinco entre quinze isolados foram multiresistentes e no frigorífico III dezenove foram multiresistentes entre 58 isolados.

A rápida propagação de linhagens epidêmicas multiresistentes de certos fagotipos e a transferência horizontal dos genes de virulência contribuem para a resistência em outros fagotipos de *Salmonella* Typhimurium além do DT104, que atualmente é o mais monitorado nesse sentido (POPPE, C. et al., 1998; RABSCH, W.; TSCHPE, H.; BAUMLER, A.J., 2001).

Outra importante verificação foi a presença de resistência de antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções em humanos, pois deve-se levar em consideração

que a maioria dos casos de salmonelose em humanos resulta da transmissão de animal para humanos (RABSCH, W.; TSCHPE, H.; BAUMLER, A.J., 2001).

A fagotipificação e a resistência a antimicrobianos de linhagens de *S.Typhimurium* têm sido empregadas na detecção da fonte de infecção de muitos surtos causados por *Salmonella* sp. (RABSCH, W.; TSCHPE, H.; BAUMLER, A.J., 2001; WARD, L.R.; THRELFALL., E.J., 2001). Entretanto no presente estudo o perfil de resistência esteve mais relacionado com o frigorífico de origem das amostras do que com suas características fenotípicas ou genotípicas. Assim, o perfil da sensibilidade a antimicrobianos em *Salmonella* sp. isolada de suínos no RS será mais importante para monitorar e prevenir a transmissão dessas linhagens resistentes para humanos através do consumo de carne suína e derivados, do que como técnica de caracterização de linhagens.

O quarto trabalho testou a sensibilidade e resistência das 96 linhagens de *Salmonella.Typhimurium* incluídas nos demais trabalhos, frente aos desinfetantes quaternário de amônio e iodofor, a fim de verificar a sensibilidade dessas linhagens isoladas de suínos frente a estes desinfetantes. Todas as amostras em estudo foram sensíveis ao quaternário de amônio independente do tempo de contato e da concentração indicada pelo fabricante ou na sub-concentração de uso. Por outro lado, frente ao iodofor quatro amostras apresentaram resistência a concentrações recomendadas pelo fabricante e 59 foram resistentes na sub-concentração de uso. Esse estudo teve como objetivo obter mais informações a respeito do nível de resistência das amostras que já haviam demonstrado seu perfil de multiresistência variado frente aos antimicrobianos. Estes desinfetantes por sua vez, são alguns dos mais utilizados na suinocultura (KICH, J.D. et al., 2004). Ao lado disso, este monitoramento é de grande importância para a validação do uso de desinfetantes em agroindústrias e avaliação da desinfecção no controle da transmissão de microrganismos indesejáveis.

Para determinar quais das técnicas de tipificação seriam as mais adequadas para este tipo de estudo, alguns critérios como a reprodutibilidade, tipabilidade, facilidade de execução e poder de discriminação das linhagens foram avaliados.

Para a reprodutibilidade, que é a capacidade da técnica em obter repetidamente o mesmo perfil de resultados, os isolados, nas técnicas REP-PCR, ERIC-PCR e PFGE,

foram analisados repetidas vezes, demonstrando sempre os mesmos perfis ao longo das repetições.

Já para tipicidade, que se refere à proporção de isolados que podem ser registrados num sistema de tipificação e atribuído um tipo, todas as linhagens foram tipificáveis por todas as técnicas, com exceção da fagotipificação que não foi capaz de tipificar (UT) quatro isolados.

Para o critério facilidade de execução, existem algumas limitações para todas as técnicas que devem ser consideradas. O método de hibridização, IS200, que utiliza uma sonda, algumas vezes marcada radioativamente, tornando esta técnica de difícil execução em certos laboratórios. Ao lado disso, é uma técnica laboriosa e de custo elevado. Para a técnica de fagotipificação a limitação está relacionada com o fato de poder ser realizada apenas em laboratórios de referências. No Brasil a Fundação Instituto Osvaldo Cruz (Fiocruz), centro de referência para *Salmonella* sp., não está realizando a fagotipificação em *S. Typhimurium*, o que determina que se tenha que enviar os isolados para centros de referências em outros países. Outro fator que deve ser considerado é o custo e a disponibilidade de equipamentos. As técnicas de REP-PCR e ERIC-PCR exigem equipamento básico como um termociclador e são relativamente fáceis e baratas, quando comparada com outras técnicas, apesar de não terem sido capazes de discriminar as linhagens em estudo. Por outro lado, a técnica de PFGE necessita de equipamento de eletroforese em campo pulsado, reagentes caros e consome muito tempo para obtenção do resultado.

Para calcular o poder de discriminação usou-se o índice de discriminação de acordo com HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. (1988) (APÊNDICE A). Este índice é baseado na probabilidade que um sistema de tipificação atribua diferentes tipos para duas linhagens não relacionadas, amostradas ao acaso de uma população, e que pode ser avaliadas pelo índice de discriminação de Simpson ( $D$ ).

Através desse índice conseguiu-se verificar o poder de discriminação de cada técnica utilizada nestes estudos. O poder de discriminação variou dependendo da técnica utilizada. A técnica de determinação do perfil IS200 teve índice ( $D=0,1$ ) bastante baixo. A fagotipificação ( $D= 0,72$ ) sozinha demonstrou ser a melhor técnica seguida pela PFGE ( $D=$

0,56). Por outro lado, quando foi analisada a combinação da fagotipificação com a PFGE obteve-se um melhor índice de discriminação ( $D= 0,87$ ) que pode ser considerado satisfatório. Este estudo demonstrou a importância de associar mais de uma técnica e concluiu que a fagotipificação e a PFGE são as melhores técnicas para serem utilizadas para estudos epidemiológicos de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.

Ao lado disto, observou-se que há um grau de clonalidade nas linhagens isoladas dentro das empresas que produzem e abatem suínos no Rio Grande do Sul. Esta conservação clonal pode ser explicada pelo tipo de sistema utilizado pelo frigorífico, pois utilizam um sistema integrado vertical, onde existe a padronização da alimentação, da genética e da técnica. Nesse sentido, as técnicas de tipificação podem ser úteis no esclarecimento da transmissão de *Salmonella* sp ao longo da cadeia produtiva.

Contudo, é necessário levar em consideração que a aplicabilidade desses métodos na rotina da indústria é pouco viável, sendo necessária a parceria com instituições de pesquisa para que se alcancem esses objetivos. Com a definição dos pontos de contaminação, a indústria poderá então, implementar programas de controle e monitoramento mais objetivos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENDER, J. B. et al. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **New England Journal Medical**, v.344,n.3, p.189-195, 2001.
- BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal Veterinay Research**, 24, 80-84, 2004.
- BEUZÓN, C.R.; CHESSA, D.; CASADESÚS, J. IS200: an old and still bacterial transposon. **International Microbiology**, v.7, p.3-12, 2004.
- CASTAGNA, S.M.F. et al. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scient Veterinariae**, v.32, p.141-147, 2004.
- CAUDURO, P.F.; MEZZANI, A.; DIAS, C.A.G. Isolamento de *Salmonella* Tennessee em fezes humanas no Rio Grande do Sul. **Revista Microbiologia**, v.17, n.2. p.113-159, 1986.
- DALY, M.; FANNING, S. Characterization and Chromosomal Mapping of Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.11, p.4842-4848, 2000.
- DIAS, R.S.; CARMO, L.S.; SILVA, M.C.C. Surto de toxinfecção alimentar causado pela ação simultânea de enterotoxina estafilocócica e *Salmonella* Enteritidis. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.58, n.1., p.7-11, 1999.
- ESPER, M.R.N.R. et al. *Salmonella*: Sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.57 n.2, p. 45-50, 1998.
- GEBREYES W. A. et al. Characterization of antimicrobial-resistant phenotypes and genotypes among *Salmonella enterica* recovered from pigs on farms, from transport trucks, and from pigs after slaughter. **Journal of Food Protection**, v.67, n.4, p.698-705, 2004.
- GEIMBA, M.P. et al.. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal Food Protection**,v. 67, p.1229-1233, 2004.
- GUERRA, B. et al. Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. **FEMS Microbiology Letters**, v.190, n.2, p.341-347. 2000.



- HIRSH, D.C. *Salmonella*. In: BIBERSTEIN, D.V.M.; ZEE, Y.C. REVIEW of Veterinary Microbiology. Boston: Blackwell Scientific Publications, Inc., 1990. p. 110-115.
- HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26,n.11, p.2465-2466, 1988.
- JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na grande SãoPaulo, no período de 1994-1997. **Revista Inst. Adolfo Lutz**, v.58,n.1, p.47-51,1999.
- KARIUKI, S.et al. Genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotypes typhimurium from two regions of Kenia. **Immunology and Medical Microbiology**, v.29, p.9-13, 2000.
- KICH, J.D. et al. Evaluation of the antibacterial activity of six commercial disinfectants against *Salmonella* Typhimurium strains isolated from swine. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 1, p. 33-39, 2004.
- LAILLER, R.et al. Subtyping of *Salmonella* Typhimurium by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. **Pathology Biology**, v.50, p.361-368, 2002.
- LANDGRAF, M.; GONÇALVES, J.A.; FALCÃO, D.P. Surto de toxinfecção alimentar por *Salmonella* Bredeney. **Revista Saúde Pública**, v.19, p.92-93, 1985.
- LIEBISCH, B; SCHWARZ, S. Evaluation and comparison of molecular techniques for epidemiological typing of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar *dublin*. **Journal Clinical Microbiology**, v.34, p.641-646, 1996.
- LINTON, A.H. Salmonellosis in pigs. **British Veterinary Journal**, London, v.135, n. 2, p.109-112,1979.
- MILLEMANN Y.et al. Value of plasmid profiling ribotyping and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *salmonella enteritidis*. **Journal of clinical Microbiology**,v.33,n.1, p.173-179, 1995.
- MILLEMANN, Y. et al. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp.*enterica* serotype Typhimurium bovine isolates from farm to meat. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38,n.6, p.2204-2209, 2000.
- MOO, D. et al. The isolation of *Salmonella* from jejunal and caecal lymph nodes of slaughtered animals. **Australian Veterinary journal**, v.56, p.181-183, Apr.1980.
- OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.

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

PASMANS, F. et al. Host adaptation of pigeon isolates of *Salmonella* Typhimurium variant Copenhagen pahege type 99 is associated with enhanced macrophage cytotoxicity. **Infection and Immunity**, v.71, n.10, p.6068-6074, 2003.

PONTELLO, M. et al. community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy. **Epidemiology and Infection**, v.120, p.209-214, 1998.

POPPE, C. et al. *Salmonella* Typhimurium DT104: A virulent and drug-resistance pathogen. **Canadian Veterinary Journal**, v.39, p.559-565, 1998.

RABSCH, W.; TSCHPE, H.; BAUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, v.3, p.237-247, 2001.

RABSCH, W. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. **Infection Immunology**, v.70, p.2249-2255, 2002.

RUBINO, S. et al. IS200 fingerprint of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium human strains isolated in Sardinia. **Epidemiology and Infection**, v. 120, 215-222, 1998.

SANDVANG, D. et al. Persistence of a *Salmonella enterica* serotype Typhimurium clone in Danish pig production units and farmhouse environment studied by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **FEMS Microbiology Letters**, v.187, p.21-25, 2000.

SAUER, S. et al. An outbreak caused by *S. Typhimurium* DT177, B<sub>Ta</sub> in Bavaria characterized by an unusual antibiotic resistance and plasmid profile. In INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* AND OTHER FOODBORNE PATHOGENS IN PORK, 4., **Proceedings**. Leipzig, Germany, 2001. p.361-363.

SOBESTIANSKY, J. et al. Salmonelose. In: \_\_\_\_\_ (Eds.) Clínica e patologia suína. Goiânia: [S.n.], 1999. 464p.

SOTO S M. et al. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* SEROVAR Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v.71, p.35-43, 2001.

SWANENBURG, M; KEUZENKAMP, D.A.; SNIJDERS, J.M.A.. Validation of ERIC PCR as a tool in epidemiologic research of *Salmonella* in slaughter pigs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 21, p. 141-144, 1998.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P; SNIJDERS, J.M.A. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal Food Microbiology**, v.70, p.243–254, 2001.

TSEN H. Y.; LIN,J.S.; HSIEN,H.Y. Pulsed field gel electrophoresis for animal *Ssalmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.73-80, 2002.

VERSALOVIC, J.et al. Genomic Fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v.5, p. 25-40, 1994.

WARD,L.R.; THRELFALL,E.J. The emergence of a new *Salmonella* Typhimurium phage type associated with pigs. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* AND OTHER FOOD BORNE PATHOGENS IN PORK: SALINPORK, 4., **Proceedings**. Leipzig, Germany, 2001. p.174-176.

WEGENER, H. C.; BAGGESEN, D.L.; GAARSLEV K. *Salmonella typhimurium* phage types from human salmonellosis in Denmark 1988-1993. **APMIS**, v.102, p.521-525, 1994.

WEGENER, H.K. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. **Current Opinion Microbiology**, v.6, p.439-445, 2003.

WEIGEL, R M. et al. Identification of patterns of transmission of *Salmonella* within swine production systems using pulsed field gel eletrophoresis (PFGE) and repetitive sequence polymerase chain reaction (REP-PCR): a quantitative analysis. **Berliner- Muenchener Tieraerztliche Wochenschrift**, v., p. 566-573, 2001.

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, p.295-301, 2002.

## CONCLUSÕES FINAIS

- A caracterização genotípica por IS200 demonstrou um baixo poder de discriminação, sendo a diversidade dos padrões observada apenas nas linhagens que apresentaram a região *spvR* e padrões bastante distintos de fagotipificação e PFGE.
- A rep-PCR, utilizando os oligonucleotídeos para ERIC e REP, não foi capaz de discriminar amostras de *S. Typhimurium*.
- Doze diferentes fagotipos foram detectados, sendo os mais encontrados o DT177 e RDNC'1.
- A maioria das 97 linhagens de *Salmonella Typhimurium* apresentou resistências à tetraciclina, estreptomicina e sulfonamida.
- Todos os isolados foram sensíveis ao composto quaternário de amônio testado, mas o comportamento frente ao iodophor foi influenciado pela concentração do produto.
- A análise por macro-restrição detectou doze padrões diferentes, sendo que a maioria de isolados concentraram-se no perfil A.
- A associação da fagotipificação e PFGE propiciou uma melhor discriminação de isolados de *S. Typhimurium*, sendo portanto indicada.
- Houve a presença de uma linhagem clonal entre os isolados, sugerindo possíveis pontos comuns na cadeia de transmissão de *Salmonella sp.*

## **APÊNDICES**

**APÊNDICE A - Índice de Discriminação de Simpson e poder de discriminação das técnicas fenotípicas e genotípicas empregadas no presente estudo**

**Índice de Discriminação de Simpson:**

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j (n_j - 1)$$

Onde:

$N$ = número total das linhagens da espécie

$n_j$ = número de linhagens de padrões diferentes da espécie

$S$ = número total de tipos descritos

**Tabela 1:** Poder de discriminação das técnicas fenotípicas e genotípicas empregadas no presente estudo

<b>Técnica</b>	<b>Nº Tipos</b>	<b>Index de Discriminação (D)</b>
IS200	4	0,10
REP-PCR	1	0
ERIC-PCR	1	0
DT	12	0,72
PFGE	12	0,56
DT+PFGE	27	0,87

$D=1$ : indica que a técnica é capaz de discriminar cada membro de uma população de todos os outros membros da população.

$D=0$ : indica que todos os membros de uma população foram de um tipo idêntico

**APÊNDICE B-** Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipificação, presença do antígeno O5, padrões de IS200 e padrões de PFGE de linhagens de *S. Typhimurium* isoladas entre 1999 e 2000 no matadouro-frigorífico I, II e III

**a)**

Frigorífico I										
Strain	Date	Farm	Source	Antibiotic Resistance	DT	O5	IS200	SPVR	PFGE	
16B	16/11/1999	16	LM	ApCmStSu	177	0	A			F
18B	16/11/1999	16	F	CmSmStSu	177	0	A			F
25E	24/11/2000	19	LM	ApCmNaSmStSuTe	177	+	A			E
26E	24/11/2000	19	F	ApCmNaSmStSuTe	177	+	A			A
3H	27/3/2000	22	LM	ApNaSmSuTe	177	+	A			A
4H	27/3/2000	22	F	ApNaSmSuTe	177	+	A			A
17L	31/5/2000	25	LM	AmiCmSuTe	177	0	A			K
19L	31/5/2000	25	F	CmNeStSuTe	177	0	A			K
43L	31/5/2000	26	LM	ApCmNaSmStSuTe	177	+	A			A
45L	31/5/2000	26	F	ApCmNaSmStSuTe	177	+	A			A
14B	16/11/1999	16	LM	ApSmSuTe	UT	+	A			A
22B	16/11/1999	16	F	ApAmiCmCFCGmNaNeSmStSuTeTo	177	0	A			F
32B	16/11/1999	17	F	ApCmNaSmSuTe	177	+	A			A
34B	16/11/1999	17	F	ApCmNaSmStSuTe	177	+	A			A
36B	16/11/1999	17	F	ApCmNaSmSuTe	177	+	A			A
37B	16/11/1999	18	F	ApSmTeTo	177	+	A			A
39B	16/11/1999	18	LM	ApCmStSuTeTo	177	+	A			F
18E	24/1/2000	21	F	ApCmNaSmSuTe	177	+	A			A
19E	24/1/2000	20	F	ApCmNaSmStSuTe	177	+	A			E
14H	27/3/2000	23	F	ApNaSmSuTe	177	+	A			A
21H	27/3/2000	23	F	ApNaSmSuTe	177	+	A			A
24H	27/3/2000	24	F	ApCmGmNaSmSuTeto	177	+	A			A
2L	31/5/2000	27	F	CmStSuTe	177	0	A			H
10L	31/5/2000	27	F	CmStSuTe	177	0	A			F
12L	31/5/2000	27	F	CmNeSmStSuTe	177	0	A			F
15L	31/5/2000	28	F	CmStSuTe	177	0	A			F
39L	31/5/2000	29	F	ApCmGmNaSmStSuTeTo	177	+	A			I
9H*	27/3/2000	30	F	NaSmSuTe	177	+	A			-
16H*	27/3/2000	31	LM	ApNaSmSuTe	177	+	A			-
32H*	27/3/2000	31	LM	ApNaSmSuTe	177	+	A			-
5L*	31/5/2000	28	LM	CmNeSmStSuTe	177	0	A			-
25L*	31/5/2000	32	LM	CmSmStSuTe	177	0	A			-

\* Linhagens presentes apenas no artigo do capítulo 2

b)

<b>Frigorífico II</b>									
<b>Strain</b>	<b>Date</b>	<b>Farm</b>	<b>Source</b>	<b>Antibiotic Resistance</b>	<b>DT</b>	<b>O5</b>	<b>IS200</b>	<b>SPVR</b>	<b>PFGE</b>
4M	12/7/2000	35	LM	NeSuTe	194	0	A		A
6M	12/7/2000	35	F	CmNaSmTe	177	+	A		A
20M	12/7/2000	36	LM	SuTe	194	0	A		A
22M	12/7/2000	36	F	SuTe	194	0	A		A
27M	12/7/2000	35	LM	SmSuTe	194	0	A		A
28M	12/7/2000	35	F	NaNeSmSuTe	UT		A		A
17I	13/4/2000	33	F	Su	177	+	A		A
23I	13/4/2000	34	LM	Su	18	+	D	+	J
10M	12/7/2000	37	LM	SuTe	194	0	A		A
13M**	12/7/2000	35	LM	SuTe	194	0	-		F
25M	12/7/2000	35	F	NaNeSmSuTe	192	+	A		A
34M	12/7/2000	38	LM	SmSuTe	194	0	A		F
1M*	12/7/2000	39	F	CmNaSmStSuTe	177	+	A		-
8M*	12/7/2000	35	LM	SuTe	194	0	A		-
18M*	12/7/2000	36	LM	SmStSuTe	194	0	A		-

\* Linhagens presentes apenas no artigo do capítulo 2

\*\* : Linhagem ausente apenas no artigo do capítulo 2



c)

Frigorífico III									
Strain	Date	Farm	Source	Antibiotic Resistance	DT	O5	IS200	SPVR	PFGE
29SA*	18/9/2000	4	LM	NaGmSmSuTe	UT	-			A
30SA*	18/9/2000	4	F	Te	177	+			A
1D	10/1/2000	2	LM	Sensível	99	0	B	+	L
22D	10/1/2000	1	F	CmNaNeSmStSuTe	192	+	A		A
10J	8/5/2000	3	LM	Su	8	+	C		L
1SG*	14/5/2001	9	LS	SmSuTe	RDNC2	0			A
2SG*	14/5/2001	9	T	SmSuTe	RDNC2	0			A
3SG*	14/5/2001	9	LS	SmSuTe	RDNC1	0			C
5SG*	14/5/2001	9	T	SmSuTe	RDNC2	0			A
6SG	14/5/2001	9	LS	SmTe	RDNC2	0	A		A
8SG*	14/5/2001	9	T	SmSuTe	RDNC2	0			A
11SG*	14/5/2001	9	LS	SmStSuTe	RDNC1	0			I
12SG*	14/5/2001	9	T	SmSuTe	126A	0			I
16SG*	14/5/2001	10	LS	SmSuTe	RDNC1	0			I
18SG	14/5/2001	10	T	SmStSuTe	RDNC1	0	A		I
20SG*	14/5/2001	10	LS	SmStSuTe	RDNC1	0			A
21SG	14/5/2001	10	T	SmSuTe	RDNC1	0	A		A
22SG*	14/5/2001	10	LS	SmSuTe	RDNC1	0			A
23SG*	14/5/2001	10	T	SmSuTe	RDNC1	0			G
51SG	14/5/2001	11	LS	SmTe	RDNC1	0	A		A
37SG*	14/5/2001	11	T	CmNaSmTe	193	+			B
42SG*	14/5/2001	11	LS	CmNaSmTe	177	+			A
43SG*	14/5/2001	11	T	GmNaSmSuTe	177	+			A
45SG*	14/5/2001	11	LS	SmTe	RDNC1	0			A
46SG*	14/5/2001	11	T	SmTe	RDNC1	0			A
52SG*	14/5/2001	11	LS	SmTe	RDNC1	0			E
53SG*	14/5/2001	11	T	CmSmTe	177	0			A
47SG*	14/5/2001	12	LS	NaSmTe	177	0			A
48SG*	14/5/2001	12	T	SmTe	177	+	-		A
1SH*	9/7/2001	9	LS	NaSmTe	RDNC1	0	-		A
3SH	9/7/2001	9	T	SmSuTe	RDNC1	0	A		A
5SH*	9/7/2001	14	LS	NaSmTe	177	+	-		A
6SH*	9/7/2001	14	T	NaSmTe	177	+	-		A
9SH	9/7/2001	9	LS	NaSmTe	177	+	A		A
11SH	9/7/2001	9	T	NaSmSuTe	177	+	A		A
24SA	18/9/2000	4	F	ApCmNeStSuTe	177	+	A		A
26SA	18/9/2000	4	LM	ApCmNeSmStSuTeTo	177	+	A		E
8SB	16/10/2000	5	LM	GeSmSuTe	RDNC4	+	A		D
22SB	16/10/2000	5	T	ApGmStSuTe	177	+	A		D
3SC	20/11/2000	6	LM	Te	194	+	A		A
18SD	11/12/2000	7	LM	Te	68	+	A	+	L
1SE	15/1/2001	8	T	StTe	177	+	A		A
4SE*	15/1/2001	8	T	CmNaTe	177	+	-		A
9SG*	14/5/2001	9	T	SmSuTe	RDNC1	0	-		G
14SG*	14/5/2001	13	LS	Sm	RDNC1	0	-		A
25SG	14/5/2001	13	LS	SmSuTe	RDNC1	0	A		K
39SG*	14/5/2001	11	LS	SmSuTe	RDNC1	0	-		I
54SG	14/5/2001	12	LS	NaTe	177	+	A		A
49SG*	14/5/2001	12	T	SmTe	RDNC1	0	-		A
8SI*	13/8/2001	15	LS	CmNaSmTe	RDNC1	0	-		A
10SI*	13/8/2001	15	LS	Te	177	+	-		A
9SI*	13/8/2001	15	LS	SmTeTo	177	+	-		A
13SJ*	10/9/2001	-	E	CmNaSmStSuTe	193	0	-		A
1SL*	1/10/2001	-	E	CmNaSmStSuTeTo	193	0	-		A
5SL*	1/10/2001	-	E	Sensível	UT	-	-		A
17SL*	1/10/2001	-	E	ApNaSmStSuTe	177	+	-		A
20SL*	1/10/2001	-	E	CmNaSmStSuTe	193	+	-		A
23SL*	1/10/2001	-	E	ApCmNaSmTe	193	+	-		A

\* Linhagens ausentes no artigo do capítulo 2