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

Pesquisa de Fatores Associados à Virulência de *Salmonella* Hadar Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Dissertação de Mestrado

Marco Aurélio de Oliveira Cesco

Porto Alegre
2010

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

Pesquisa de Fatores Associados à Virulência de *Salmonella* Hadar Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Autor: Marco Aurélio de Oliveira Cesco

Dissertação apresentada como
Requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Veterinárias
na área de Medicina Veterinária
Preventiva.

Orientador: Professor Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento

Porto Alegre
2010

C421p Cesco, Marco Aurélio de Oliveira

Pesquisa de fatores associados à virulência de Salmonella Hadar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). / Marco Aurélio de Oliveira Cesco. – Porto Alegre: UFRGS, 2010.

84 f. ; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2010. Vladimir Pinheiro do Nascimento, Orient.

1. Avicultura 2. Sanidade avícola 3. Salmonella Hadar 4. PCR: aves I. Nascimento, Vladimir Pinheiro, Orient. II. Título.

CDD 619.4

Catalogação na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

Pesquisa de Fatores Associados à Virulência de *Salmonella* Hadar Através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Marco Aurélio de Oliveira Cesco

Aprovado em 24 de fevereiro de 2010:

APROVADO POR:

_____

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

_____

Professor Dr. Carlos Tadeu Pippi Salle
Membro da Comissão

_____

Professora Dra. Anderlise Borsoi
Membro da Comissão

_____

Professora Dra. Luciana Ruschel dos Santos
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Professor Vladimir Pinheiro do Nascimento, pois foi ele quem possibilitou o desenvolvimento deste trabalho e assim fez com que eu conseguisse atingir mais essa meta.

Aos colegas do CDPA, professores, pós-graduandos, funcionários e estagiários, tendo muito a agradecer a todos, resumo dizendo que foi uma alegria, um prazer, uma honra ter estado ao lado de cada um de vocês durante, vejo agora, esse curto período de tempo.

Aos Médicos Veterinários Francisco Xavier Bersch e Ubirajara Roberto de Oliveira que me orientaram e convenceram a ingressar no mestrado.

Agradeço com muito afeto a todos os meus familiares e amigos, em especial minha avó Olga, minha irmã Gabriela, meu pai Celito Cesco, meu padrasto João Vanin, e principalmente a minha mãe Sandra, para quem dedico de todo o coração mais essa conquista, afinal, mais uma vez foi quem mais me apoiou, incentivou e acreditou em mim fazendo com que tudo acontecesse. A ela o meu muitíssimo obrigado.

E por fim agradeço a Deus, pois sem ele nada é possível, e ao meu avô que a todo o tempo me olha e guia lá de cima me dando paz e tranqüilidade para seguir em frente.

"A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído..."
(Confúcio)

RESUMO

A *Salmonella* continua sendo um dos principais problemas para a avicultura mundial. Os mecanismos pelos quais ela interage com o seu hospedeiro para causar doenças são complexos e dependem de vários fatores que ainda não foram completamente elucidados. Ainda estamos começando a entender como esse mecanismo funciona a nível molecular. Genes associados à virulência, resistência a antimicrobianos e adaptação ao meio em que vivem são considerados fatores de virulência em todas as bactérias. Neste trabalho sete protocolos para PCR (*Polimerase Chain Reaction*), testados internacionalmente, foram padronizados para a pesquisa de genes associados à virulência de *Salmonella* sp. em sua fase de aderência e invasão celular. Após a padronização dos protocolos, foi realizada a pesquisa desses sete genes em 41 amostras de *Salmonella* Hadar (*S.* Hadar), levando-se em conta a importância que esse sorovar vem adquirindo nos últimos anos. Também foram traçados o perfil de resistência a antimicrobianos e o perfil bioquímico nessas amostras de *S*. Hadar. Os sete protocolos para PCR se mostram viáveis para a pesquisa dos genes. Ao analisar as 41 amostras de *S*. Hadar para os genes estudados neste trabalho foram encontrados quatro perfis genéticos diferentes, sendo que apenas os genes *sop*E (*Salmonella Outer Protein*) e *avr*A (*Avirulence*), apresentando positividade em 4 e 7 amostras respectivamente, variaram entre os perfis. No teste com os antimicrobianos 73,17% das cepas se mostraram resistentes para a tetraciclina e ainda foram observados altos índices de resistência para a estreptomicina (31,70%) e ampicilina (29,27%). 13 cepas apresentaram multiresistência, sendo assim resistentes a dois ou mais agentes antimicrobianos. Os testes bioquímicos confirmaram todas as amostras como pertencentes ao gênero *Salmonella,* apresentando variações apenas nos testes de TSI em sua região de bisel, LIA em sua região de bisel, citrato e principalmente a arginina e o dulcitol.

ABSTRACT

Salmonella remains one of the biggest problems for the poultry industry. The mechanisms by which it interacts with its host to cause disease are complex and depend on several factors that have not been fully elucidated. Although we are just beginning to understand how this mechanism works at a molecular level. Genes associated with virulence, antibiotic resistance and adaptation to environment are considered virulence factors in all bacteria. In this work seven protocols for PCR (Polymerase Chain Reaction), tested internationally, have been standardized for detection of genes associated with virulence of Salmonella sp. *in its phase of adhesion and cell invasion. After the standardization of protocols, was performed a research for this seven genes in 41 strains of Salmonella* Hadar *(S.* Hadar*), considering the importance of this serovar has acquired in the last years. Were also tested the antimicrobial resistance profile and biochemical profile in these samples of S.* Hadar*. The seven protocols for PCR are shown viable to the research of genes. Analyzing the 41 samples of S.* Hadar *for the genes studied in this work were found four different genetic profiles, in with only the sopE (Salmonella Outer Protein) and avrA (Avirulence) genes varied between the profiles, showing positivity in 4 and 7 samples respectively. In the test with the antimicrobials agents 73,17% of the strains proved resistant for tetracycline, and were still observed high levels of resistance to streptomycin (31,70%) and ampicillin (29,27%). Thirteen strains showed multidrug resistance, being resistant to two or more antimicrobial agents. Biochemical tests confirmed all samples as belonging to the genus Salmonella, with variations only in the tests of TSI in the region of the bezel, LIA in the region of bezel, citrate and especially arginine and dulcitol.*

SUMÁRIO

RESUMO..... 6

ABSTRACT..... 7

1 **INTRODUÇÃO**……..……..…….. 12

2 **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**……...…….. 15

2.1 **Salmoneloses**..... 15

2.1.1 O agente…….……...……...…… 15

2.1.2 Epidemiologia e importância em saúde pública..... 16

2.1.3 Salmoneloses em aves..... 18

2.1.4 *Salmonella* Hadar..... 20

2.2 **Resistência a Antimicrobianos**..... 21

2.3 **Propriedades Bioquímicas de *Salmonella***..... 23

2.3.1 Testes utilizados na caracterização bioquímica de *Salmonella*..... 24

2.3.1.1 Provas da oxidase e catalase..... 24

2.3.1.2 Utilização de fontes de carboidratos..... 25

2.3.1.3 Utilização de fontes de aminoácidos e deaminação da fenilalanina..... 25

2.3.1.4 Utilização do citrato e malonato..... 26

2.3.1.5 Produção de urease, H_2S, motilidade e indol..... 26

2.4 **Fatores Associados à Virulência de *Salmonella***..... 27

2.4.1 Patogenicidade e genes de virulência..... 28

2.4.1.1 Genes cromossomais……..…… 28

2.4.1.1.1 Fímbrias e genes fimbriais…..……..... 28

2.4.1.1.2 Ilhas de patogenicidade (IPs) e genes de invasão celular..... 30

2.4.1.2 Plasmídeos e genes plasmidiais..... 32

3	**MATERIAL E M ÉTODO**……..……	34
3.1	**Padronização dos Protocolos de PCR**.....	34
3.1.2	Realização dos testes de PCR.....	35
3.2	**Pesquisa de Genes de Virulência, perfis bioquímicos e de resistência a antimicrobianos em amostras de *Salmonella* Hadar**.....	36
3.2.1	Amostras de *Salmonella* Hadar……..……	37
3.2.2	Pesquisa de genes de virulência.....	37
3.2.3	Perfil bioquímico.....	38
3.2.3.1	Controles dos testes bioquímicos.....	39
3.2.4	Perfil de resistência a antimicrobianos.....	41
4	**RESULTADO**.....	42
4.1	**Padronização dos Protocolos de PCR**.....	42
4.2	**Pesquisa dos Genes de Virulência em Amostras de *Salmonella* Hadar**.....	42
4.3	**Perfil Bioquímico em Amostras de *Salmonella* Hadar**.....	45
4.4	**Resistência a Antimicrobianos em Amostras de *Salmonella* Hadar**.....	48
4.5	**Relação Entre Presença de Genes, Perfil de Resistência a Antimicrobianos e Perfil Bioquímico nas Amostras de *Salmonella* Hadar**.....	49
5	**DISCUSSÃO**……..……	51
6	**CONCLUSÃO**……..……	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS……		58
ANEXO A	Quadro com fonte e o ano de isolamento das *Salmonella* Hadar utilizadas no trabalho.....	74
ANEXO B	Tabela com os antimicrobianos utilizados e seus respectivos halos de acordo com a NCCLS de 2005.....	76
ANEXO C	Artigo publicado na revista Veterinária em Foco v.6, n.2, p. 159-164 – jan/jun. 2009.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Genes pesquisados, localização genômica, tamanho de *amplicom* e trabalhos de referência.....	35
Tabela 2	Controles positivos e negativos utilizados nas reações de PCR para cada gene..	36
Tabela 3	Bioquímicos utilizados, região/produto a serem avaliados em cada meio testado e resultados esperados para as *Salmonella* paratíficas.....	39
Tabela 4	Bactérias utilizadas como controles positivos e seus respectivos testes bioquímicos.....	40
Tabela 5	Condições finais de reagentes e para termociclador para cada gene testado.....	42
Tabela 6	Resultado da pesquisa de genes associados à virulência nas 41 amostras de *Salmonella* Hadar testadas.....	43
Tabela 7	Resultado dos testes bioquímicos nas 41 amostras de *Salmonella* Hadar.....	46
Tabela 8	Resultado dos perfis de resistência a antimicrobianos para as 41 amostras de *Salmonella* Hadar testadas.....	48
Tabela 9	Relação entre a presença de genes, resistência a antimicrobianos e variação dos testes bioquímicos.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *inv*A (284pb).....	43
Figura 2	Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *hil*A (497pb).....	43
Figura 3	Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *lpf*A (250pb).....	44
Figura 4	Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *agf*A (350pb).....	44
Figura 5	Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *avr*A (385pb).....	44
Figura 6	Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *sop*E (398pb).....	44
Figura 7	Imagem de gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *spv*C (669pb).....	45
Figura 8	Bateria de testes bioquímicos não inoculados.....	47
Figura 9	Bateria de testes bioquímicos inoculados com *Salmonella* Hadar após 24 horas de incubação.....	47
Figura 10	Antibiograma de *Salmonella* Hadar.....	49

1. INTRODUÇÃO

Em 2008 a avicultura nacional, apesar da crise registrada no último trimestre do ano, atingiu mais de 11 milhões de toneladas de carne de frango produzidas, terceiro maior volume mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, registrando um aumento de 8,16% em relação ao ano de 2007. Aumento inferior a média de 22% que o país atingiu nos últimos 10 anos, (com exceção do ano de 2005 em que a avicultura sofreu um declínio em decorrência da Influenza H5N1), no entanto se levarmos em conta o cenário em que a economia se encontrava é um crescimento bastante generoso. Além disso, as exportações foram as mais expressivas do mercado internacional, com 3,6 milhões de toneladas, o que representa 40% do mercado internacional, resultado que manteve o Brasil como maior exportador mundial de carne de frango. Neste contingente é que se encontra a responsabilidade dos produtores de aves na manutenção da segurança alimentar.

Dentro da cadeia produtiva, a segurança dos alimentos está consolidada como um tema primordial. A confiança na qualidade do produto que é ofertado é vital para a formação da preferência do consumidor, além disso, segurança alimentar é um dos pontos-chave na manutenção da saúde das populações. Tanto os países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento são alvos de estatísticas dramáticas quanto ao número de vítimas acometidas por doenças transmitidas por alimentos contaminados. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no mundo a cada ano, mais de 2.000.000 de pessoas morram em consequências de diarréias.

As *Salmonella* ainda são encontradas entre os principais agentes de doenças transmitidas por alimentos, e por esse motivo, governos de diversos países adotaram programas a fim de melhorar o nível de segurança alimentar. Exemplos podem ser citados em países como a Dinamarca, Suécia, Finlândia, Estados Unidos da América e Reino Unido que adotaram controles rígidos para redução de *Salmonella* em todos os níveis da cadeia alimentar (LAKE et al., 2002). O Brasil tem seus esforços concentrados no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) que visa à manutenção do status sanitário dos plantéis avícolas e no Programa de Redução de Patógenos (PRP), instituído pelo Governo Federal em outubro de 2003, visando à inocuidade dos alimentos mediante o controle do sistema de produção (BRASIL, 2003).

A presença de *Salmonella* paratíficas em frangos de corte não deve ser reconhecida somente como barreira à exportação e por seu poder de provocar danos à saúde humana, mas também deve ser considerada por sua patogenicidade à saúde animal, principalmente ao se tratar de aves no inicio do ciclo de produção. Até os 21 dias de idade o sistema imune do intestino das aves está imaturo, e por esta razão agentes patogênicos como *Salmonella* sp., *Campylobacter* sp. e *Escherichia coli* podem persistir no lúmen intestinal por longos períodos. Enteropatias (assim como as infecções por *Salmonella*) pré e neonatais podem causar prejuízos ao sistema imune, danos à mucosa intestinal e baixos parâmetros zootécnicos nas aves adultas (ITO et al., 2007).

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos que compõem um dos grupos mais complexos das *Enterobacteriaceae* com mais de 2.500 sorotipos descritos. Essas bactérias estão amplamente dispersas na natureza e podem ser encontradas no trato gastrointestinal de mamíferos, répteis, aves e insetos (KONEMAN, 1997). As *Salmonella* são extensivamente estudadas em termos de fisiologia, genética e estrutura celular sendo uma das bactérias patogênicas melhor caracterizadas em termos de virulência (DARWIN; MILLER, 1999). Apesar de tudo o que se sabe a respeito desta bactéria, o conhecimento sobre *Salmonella* a nível molecular e os mecanismos pelos quais ela interage como seus hospedeiros para causar doenças ainda são pequenos. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, tem se tornado possível a identificação de genes que sintetizam os fatores responsáveis pela sua virulência. Esse fato resultou na criação da chamada microbiologia molecular, na qual o papel e a função de genes específicos (e os fatores que eles sintetizam) na virulência dos microorganismos é o objeto de estudo (WASSENAAR; GAASTRA, 2001).

Segundo banco de dados da Organização Mundial da Saúde nos anos de 2000 a 2002, *Salmonella* (*S.*) Enteritidis, e *S.* Typhimurium são as mais prevalentes no mundo. *Salmonella* Hadar aparece com 2 % de prevalência no continente europeu e vem sendo reportada por vários países desde seu primeiro relato em 1954, em Israel. Este sorovar, da mesma forma que *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium, pertence ao grupo das salmonelas paratíficas ou zoonóticas, porém, diferente destes, *S.* Hadar, não é considerada pelo *European Union Zoonosis Council Directive* 92/117/EEC, como um sorotipo invasivo, dependendo assim da condição em que se apresenta o hospedeiro e também da virulência apresentada pela bactéria em questão para que a patologia se instale. (DESMIT et al., 1998). O resultado das infecções por *Salmonella* é determinado pelo *status* do hospedeiro e o *status* da bactéria. Enquanto idade, genética e fatores ambientais podem

determinar o *status* do hospedeiro, o status das bactérias é determinado pelos chamados fatores de virulência. A virulência das *Salmonella* é multifatorial e complexa, incluindo presença de fímbrias, flagelos, mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de entero, cito e endotoxinas, multiresistência a antimicrobianos e outros (RODRIGUES, 2005).

Com o intuito de contribuir para um melhor conhecimento dos fatores genéticos envolvidos com a patogenicidade de *Salmonella*, este trabalho teve como objetivos o estabelecimento de protocolos de PCR (*Polimerase Chain Reaction*), já estudados internacionalmente, para a pesquisa de sete genes associados à virulência em amostras de *Salmonella* sp. em sua fase de aderência e invasão celular, levando-se em conta a importância do estudo do genoma da bactéria para se ter uma melhor compreensão da interação bactéria-hospedeiro, bem como o seu potencial patogênico para o mesmo. Ainda, objetivou-se avaliar a presença de fatores de virulências em 41 amostras de *Salmonella* Hadar, utilizando-se dos protocolos de PCR testados anteriormente, além de estabelecer o perfil bioquímico e de resistência a antimicrobianos dessas amostras.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Salmoneloses

2.1.1 O agente

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e consiste em duas espécies principais, *Salmonella entérica* e *Salmonella bongori*. A *Salmonella entérica* é ainda dividida em seis subespécies: *enterica, arizonae, diarizonae, salamae, houtenae* e *indica*. *Salmonella* pertencentes à subespécie *entérica* constituem cerca de 60 % dos sorovares de *Salmonella* (LIBBY et al., 2004) e consistem em 99,5% dos microorganismos do gênero isolados (GRIMONT; WEILL, 2007). Segundo o esquema clássico de Kauffman-Wite mais de 2500 sorovares de *Salmonella* estão classificados tendo por base seus antígenos H (Flagelares), O (Somático) e ocasionalmente Vi (Capsulares) presente em alguns sorovares como Typhi e Dublin (HIRSH, 2003). Uma terceira espécie, *Salmonella subterranea*, foi descrita recentemente isolada de sedimento coletado de região aquífera em Oak Ridge, EUA. A sequência de DNA ribossomal mostrou que essa bactéria apresentou maior similaridade (96,4%) com *Salmonella bongori* (SHELOBOLINA et al., 2004).

Os membros do gênero *Salmonella* são bacilos curtos, de 0,7-1,5 x 2-5 μm, Gram negativos e não esporulados. Os biovares *Gallinarum* e *Pullorum* são imóveis e os sorovares móveis possuem flagelos peritríquios. São bactérias aeróbias ou anaeróbias facultativas, apresentam crescimento entre 5 e 45ºC, porém seu crescimento ótimo ocorre em 37ºC. Crescem em pH entre 4 e 9, sendo pH 7 o ideal. As colônias, de 2-4 mm, apresentam-se elevadas e com bordas lisas e arredondadas, fazendo-se necessárias fontes de carbono e nitrogênio nos meios de cultura (HOLT, 1994; GAST, 1997). São negativas ao teste da oxidase, indol, urease e Voges Praskauer (VP) e positivas nos testes de catalase, vermelho de metila (VM) e citrato de Simmons, ainda sendo positivas para a lisina e descarboxilação da ornitina. A maioria dos sorovares produz gás sulfídrico (H_2S). A glicose e outros carboidratos são metabolizados com produção de gás e

ácido. Normalmente são fermentadores de L-arabinose, D-sorbitol, maltose, D-manitol, D-manose, L-rhamnose, trehalose e D-xylose, porém não fermentam a lactose (GAST, 2008).

2.1.2 Epidemiologia e importância em saúde pública

As *Salmonella* têm sido relatadas entre as principais causas de toxinfecção alimentar no mundo (GAST, 1997). Um grande número de sorovares de *Salmonella* é patogênico para o homem, causando quadros que vão de um portador assintomático até, em casos mais graves, septicemia, febre entérica, artrite, infecção vascular, osteomielite entre outras, exceção se faz com os poucos sorotipos altamente adaptados a outras espécies (DARWIN; MILLER, 1999; BUTLER, KAYE, MAHON; MANUSELIS, 2000; VIDAL et al., 2003). É uma das principais causadoras de gastroenterite veiculada por alimentos em todo o mundo, e um importante problema de saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento (GUERRANT et al., 2001; PAYMENT; RILEY, 2002). A gravidade da doença varia com o sorotipo, dose, idade e condição imunológica do paciente (TURNBULL, 1979; POPPE, 1996).

A transmissão de *Salmonella* aos humanos ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados com células viáveis da bactéria. Os alimentos de origem animal, crus ou mal cozidos, principalmente carne de frango e em especial ovos, são os mais frequentemente envolvidos (GALÁN, 2001; HUMPHREY, 2004). Como *Salmonella* apresenta a habilidade de persistir no intestino de animais e de invadir tecidos, esses alimentos podem servir como veículos para transmissão desses patógenos o que representa um desafio maior à segurança alimentar (HUMPHREY, 2004; WIGLEY et al., 2005). Os ovos geralmente são contaminados com fezes que penetram através de pequenas fissuras em sua casca no momento da ovipostura. Entretanto a infecção do ovário de aves permite a incorporação de *Salmonella* diretamente no interior no ovo durante a sua formação (KAYE, 2000). Outros alimentos como cereais e vegetais podem estar ocasionalmente contaminados com *Salmonella*, mas os níveis de incidência são muito menores do que os encontrados em carnes, sendo que a contaminação de carnes bovina e ovina é menor de 1%. (KAYE, 2000; HUMPREY, 2004). Segundo Porter; Curtiss (1997), galinhas, perus e outras aves são responsáveis por mais de 40 % dos casos de salmoneloses em humanos, no entanto,

somente cerca de 10% dos sorovares já foram isolados de aves e apenas um pequeno número são encontrados frequentemente em lotes avícolas (GAST, 2008).

No Brasil temos exemplos como o de São Paulo, que de 1996 a 1999, segundo dados da Vigilância Epidemiológica do Estado, a *Salmonella* foi o principal agente etiológico de infecções transmitidas por alimentos, responsável por 75% dos surtos (NADVORNY et al., 2004). Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), divulgados no *Global Salmonella Surveillance* no Rio de Janeiro em setembro de 2005 (RODRIGUES, 2005), mostram que entre os agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos, caracterizados no Brasil no período de 1999 a 2004, o agente *Salmonella* é o mais prevalente, sendo a *S*. Enteritidis é o sorovar mais isolado. Em São Paulo de 1970 até o início de 1990, as *S*. Typhimurium e *S*. Agona foram os sorotipos mais frequentemente isolados de fontes humanas (SILVA; DUARTE, 2002). No Estado do Rio Grande do Sul entre 1994 e 1995, houve um incremento nos casos de toxinfecções alimentares noticiados pela imprensa de Porto Alegre com suspeita clínica de salmonelose, sempre associado à ingestão de produtos de origem avícola ou de alimentos preparados com ovos, como a maionese caseira (SANTOS, 2001). Estudos de surtos alimentares durante 1997 e 1999, revelaram que 35,7% das ocorrências investigadas foram causados por *Salmonella* sp., sendo que adultos de 16 a 50 anos de idade foram os mais afetados (COSTALUNGA; TONDO, 2002).

Em carcaças de frango, até o momento, são poucas as pesquisas no Brasil. Cardoso et al., (2000) em pesquisa realizada na cidade de Descalvado (São Paulo) analisaram 120 carcaças congeladas de dois abatedouros distintos. O resultado obtido foi ausência *Salmonella* nas amostras em estudo. No entanto, ainda em São Paulo, no município de Jaboticabal, 150 carcaças congeladas foram analisadas e o percentual de positividade para *Salmonella* estabelecido foi 32% (SANTOS et al., 2000). No Rio Grande do Sul, Nascimento et al. (1996) relatam a prevalência de *Salmonella* em carcaças e partes de frangos e a positividade varia de 15,1% em carcaças e 26,1% no total das amostras de partes (coxinha da asa 25,6%, peito sem ossos 25,6%, coxa e sobre coxa 30,3% e dorso 31,0%).

É improvável que as *Salmonella* sejam erradicadas da cadeia alimentar, mas pesquisas sobre a resposta das bactérias a diferentes condições ambientais podem levar a melhorias nas

estratégias de intervenções de controle auxiliando os produtores de alimentos (HUMPHREY, 2004).

2.1.3 Salmoneloses em aves

Em aves, a primeira descrição documentada de salmonelose foi feita no ano de 1885, em pombos. Somente alguns anos mais tarde, entre 1920 e 1930, foram descritos os primeiros surtos em galinhas e perus (SILVA, 1981). Nas aves, as salmoneloses são clinicamente classificadas em três doenças: a Pulorose, causada pela *S. Pullorum*, sendo que esta é altamente patogênica para pintos e particularmente se os pintos são estressados por condições ambientais, tal como pelo frio. Pintos mais velhos são mais resistentes. O Tifo Aviário, causado pela *S. Gallinarum* acomete aves adultas, sendo que nestas, os sinais clínicos são da doença septicêmica aguda, tais como; fraqueza, asas caídas, hiperexcitabilidade, paresia e diarréia, na fase crônica a principal característica observada é o fígado "bronzeado". Anemia e leucocitose se instalam rapidamente. Em muitos casos, as aves são encontradas mortas antes que quaisquer sinais tenham sido observados. As lesões consistem em hemorragias no tecido subcutâneo e órgãos parenquimatosos, pequenas áreas de necrose múltiplas no fígado, coração e no baço. E por último, as infecções paratifóides, ou Paratifo Aviário, causadas pelos sorovares não adaptados as aves. *Salmonella* pertencentes a este grupo são frequentemente encontradas em granjas de frango, no entanto podem não causar infecções clínicas, passando assim, muitas vezes despercebidas ao produtor e, aliando-se ao fato de não possuírem preferência por um hospedeiro em especial, são os principais causadores de toxinfecções alimentares em humanos (ÁVILA, 2007).

As perdas em decorrência das formas clínicas das doenças causadas pelas *Salmonella* nas aves foram no passado a principal motivação para o controle destas infecções, visto que muitos sorotipos são capazes de causar infecção letal em muitas aves jovens e infecção não letal em aves adultas, causando assim grandes perdas na produção nessa classe de aves. Atualmente, a prevenção da transmissão da *Salmonella* sp. aos humanos através dos produtos derivados de aves tem sido uma das prioridades do setor avícola (OLIVEIRA, 2000). Normalmente as *Salmonella* causadoras do Paratifo Aviário, colonizam o trato digestivo dos frangos onde podem persistir até o abate, tornando-se responsáveis pela contaminação no produto final e podendo levar os

consumidores a uma grave toxinfecção alimentar. De forma semelhante, a infecção nas galinhas poedeiras de ovos comerciais pode levar a produção de ovos contaminados e como consequencia, por em risco a saúde do consumidor (ÁVILA, 2007). Segundo Rose et al. (2000), até o momento, mais de 99% dos sorotipos de *Salmonella* identificados podem causar doenças subclínicas em aves, mas no entanto, sua maior importância continua sendo em relação à saúde pública.

A patogenicidade da *Salmonella* em aves está dividida em três fases. A primeira é a fase de colonização. A colonização da porção distal do intestino delgado e do cólon é o passo inicial e necessário na patogenia da salmonelose entérica (SATO et al., 1997). Bactérias fusiformes nativas que ocupam a mucosa do epitélio intestinal geralmente inibem o crescimento das *Salmonella* pela produção de ácidos orgânicos voláteis. A flora normal também bloqueia o acesso aos sítios de ligação necessários para instalação das *Salmonella*. Fatores que desequilibrem a flora normal tais como terapias com antimicrobianos, dietas e privação de água aumentam a susceptibilidade do hospedeiro às salmoneloses entéricas e septicêmicas. A importância das fímbrias na ligação e colonização das *Salmonella* durante a fase inicial da patogênese da enterite tem sido demonstrada em camundongos. Cepas que possuem fímbrias aderem melhor na mucosa do íleo do que as cepas isogênicas sem fímbrias e, portanto são mais infectantes. Pintos recém nascidos cuja flora intestinal não está estabelecida são mais suscetíveis a colonização. Peristaltismo reduzido também predispõe a colonização por *Salmonella* por permitir um super crescimento temporário da bactéria especialmente no intestino delgado. O peristaltismo é estimulado por uma microflora nativa ativa e a supressão desta aumenta a susceptibilidade à colonização (GOMES, 2009).

A segunda fase é a de invasão do epitélio intestinal. Esta fase envolve as extremidades superiores das vilosidades do íleo e colon. A *Salmonella* penetra na célula intestinal sem aparentemente causar a sua morte uma vez que não há mudanças morfológicas até mais tarde no processo normal da enfermidade. Os organismos podem multiplicar e infectar as células adjacentes ou passar até a lâmina própria, então são fagocitados. Após a invasão, as extremidades das vilosidades contraem e são invadidas por neutrófilos (GOMES, 2009).

Por fim a terceira fase é a fase de estímulo e exsorção de fluídos. A resposta inflamatória na mucosa intestinal é importante fator no extravasamento de fluido intestinal. Prostaglandinas

são liberadas e como resposta a essa resposta, a ativação da adenilatociclase resulta em grande secreção de água, bicarbonatos e cloretos no lúmen intestinal. A resposta inflamatória também dispara a liberação de substâncias vaso ativas que por sua vez, aumentam a permeabilidade dos vasos da mucosa intestinal levando-os a exsorção de fluidos. Essa exsorção de fluidos é acompanhada por uma grande invasão de neutrófilos nas vilosidades causando quadros de ileíte aguda e colite. Os neutrófilos são também eliminados pelas fezes e a sua presença possui valor diagnóstico. A patogenia da septicemia pela *Salmonella* está intimamente relacionada ao efeito da endotoxina liberada da parede celular bacteriana. A atividade endotóxica está associada com o componente do lipídio A do LPS (lipopolissacarídeo) da parede celular. Muitos sinais da septicemia (por *Salmonella*) são similares àquelas produzidas pela inoculação experimental de endotoxinas purificadas. Esses efeitos incluem: febre, hemorragias associadas ao consumo dos fatores de coagulação, leucopenia seguida de leucocitose, depleção do glicogênio hepático com hipoglicemia, hipotensão e choque que são freqüentemente fatais (GOMES, 2009).

2.1.4 *Salmonella* Hadar

A *Salmonella* (*S.*) Hadar, da mesma forma que *S.* Enteritidis e *S.* Typhimurium, pertence ao grupo das *Salmonella* paratíficas ou zoonóticas, porém, diferente destas, *S.* Hadar, não é considerada um sorotipo invasivo, no entanto, não há uma delimitação clara entre sorotipos invasivos e não invasivos de *Salmonella*. A *S.* Hadar já foi isolada de órgãos de aves, o que sugere uma característica invasiva a mesma (DESMIT et al., 1998).

O primeiro relato de *S.* Hadar data de 1954, em Israel, e desde então vem sendo isolada em diversos países. Na Europa a *S.* Hadar surgiu nos anos 70 (ROWE et al., 1980) e segundo o banco de dados da OMS aparece com 2% de prevalência neste continente nos anos de 2000 a 2002. Em 2005, na Espanha, mais de 200 casos de salmonelose em humanos foram provocados pelo sorovar *S.* Hadar, transmitido pelo consumo de carne de frango (EUROSURVEILLANCE, 2005). Em 1987 e 1988, foi o segundo sorovar mais prevalente em humanos e, em 1990, o sorovar mais prevalente em aves no Canadá (19,5 %) (DESMIT et al., 1998). No Brasil, em experimento realizado no estado do Rio grande do Sul, Nascimento et al. (1996), verificaram *S.* Hadar como a segunda *Salmonella* mais prevalente (26%), inferior apenas a *S*. Enteritidis (51%).

A infecção experimental de *S.* Hadar em galinhas mostrou que este sorovar possui um padrão um pouco diferente da *S.* Typhimurium. A *S.* Typhimurium apresenta maior eliminação bacteriana nas fezes por 1 ou 2 semanas depois da infecção, seguida por uma ausência da eliminação da bactéria. No entanto, a eliminação da *S.* Hadar pode permanecer alta por várias semanas (DESMIT, 1998). A diferença na duração do tempo de eliminação em galinhas sugere que a *S.* Hadar pode estar mais bem adaptada para uma colonização mais prolongada da microbiota intestinal do que foi sugerido para outros sorovares (BARROW et al., 1998). Este fato pode explicar porque o aumento da *S.* Hadar tem sido observado em alguns países nos últimos tempos, pois de acordo com Nógrády et al. (2003), a *S.* Hadar deve possuir mecanismos de adaptação ao hospedeiro, os quais fazem com que ela seja melhor adaptada ao intestino de galinhas e permitem que ela seja altamente competitiva no que diz respeito a colonização, quando comparada a outros sorovares de *Salmonella*.

2.2 Resistência a Antimicrobianos

Nos últimos 60 anos as bactérias, em particular aquelas que são patogênicas para humanos, têm estado envolvidas em casos de resistência adquirida a drogas antimicrobianas. A resistência a drogas antimicrobianas possui dois passos chave: o surgimento e a disseminação da resistência. É muito difícil impedir o surgimento de bactérias que apresentem resistência a estas drogas, porque isso ocorre ao acaso, e representa um aspecto particular da evolução bacteriana. O surgimento destas cepas resistentes pode resultar da mutação dos genes estruturais ou reguladores (genes de manutenção) ou então pela aquisição de material genético de outras bactérias. (COURVALIN, 2005). A disseminação dessa resistência tem sido repetidamente associada com o uso de drogas antimicrobianas, o que enfatiza a importância da prudência no uso destas drogas, uma idéia que é reforçada pelo fato de que a resistência, depois de adquirida, é muito lentamente revertida (CHIEW et al., 1998; ANDERSON, 2003) .

Agentes antimicrobianos são usados extensivamente na produção de frangos e são usualmente administrados via ração ou água de bebida. O uso de antimicrobianos contribuiu na transformação da indústria avícola, passando de pequenas para grandes produções que operam com uma alta eficiência (BYWATER, 2005). Os antimicrobianos são usados na produção animal

como promotores de crescimento, na profilaxia de doenças e também no tratamento de doenças infecciosas. O emprego de antimicrobianos em agropecuária, e muito especificamente em avicultura, tem recebido grande atenção, sendo objeto de muitas discussões em inúmeras reuniões científicas. Até o presente momento, não foi definitivamente estabelecida uma relação causal entre o uso de antimicrobianos em animais e o aumento de resistência em bactérias isoladas do ser humano, o que torna esta questão objeto de grandes polêmicas nos meios científicos e leigos, sejam eles nacionais ou internacionais (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005). A permissão de uso de antimicrobianos na produção animal varia muito entre países e até regiões, por exemplo, o uso de alguns antimicrobianos promotores de crescimento na Europa foi banido pela *European Union* (EU), no entanto o mesmo não ocorreu nos Estados Unidos, Canadá e em muitos outros países (GYLES, 2008).

A dinâmica da transmissão da resistência a antimicrobianos e a evolução de populações de bactérias resistentes é muito complexa e está ligada a transferência genética dos chamados genes de resistência. A avaliação da resistência a antimicrobianos a nível molecular, constitui uma ferramenta para a compreensão da participação de elementos genéticos na expressão da resistência, pois são eles que possibilitam a transferência de resistência entre bactérias (ALEKSHUN; LEVY, 2007). Os integrons são encontrados entre os elementos genéticos que contribuíram para o desenvolvimento de cepas multiresistentes entre as bactérias gram-negativas, sendo que esses elementos “capturam” diferentes cassetes de resistência e os expressam (LAPIERRE et al., 2008). Esses cassetes genéticos conferem resistência a quase todas as maiores classes de antimicrobianos que já foram identificadas, e com o potencial dos integrons em capturar e colecionar esses elementos é provável que eles se tornem ainda mais prevalentes e consequentemente continuem ameaçando o uso de antimicrobianos como agentes terapêuticos (WHITE et al., 2001). Para Guerra et al. (2003), os integrons presentes em isolados bacterianos de animais estão disseminados por todo o mundo e são considerados como a mais importante fonte de disseminação de resistência a antimicrobianos. Os integrons, presentes principalmente em bactérias gram-negativas, não podem executar transferência por eles mesmos, mas quando associados a um plasmídio, o seu potencial de transferência horizontal aumenta consideravelmente, sendo esta associação considerada um enorme risco na disseminação da resistência (ROWE-MAGNUS; MAZEL, 2001).

A transmissão de genes de resistência entre bactérias parece ser facilitada por alguns fatores, entre eles o uso de antimicrobianos em larga escala na produção animal parece ser o maior contribuinte para que cada vez mais frequentemente sejam encontradas cepas que apresentem multiresistência (GYLES, 2008). No entanto, não somente na produção animal, mas também nas medicinas humana e veterinária a utilização indiscriminada de antimicrobianos tem causado sérios problemas com implicações econômicas, políticas e sociais, tanto em países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, dificultando a terapêutica e sendo atualmente um dos maiores problemas de saúde pública (RODRIGUES; FONSECA, 2006). Este fato torna-se ainda mais importante, devido a estudos recentes que têm mostrado que as propriedades de resistência microbiana e de virulência (capacidade da bactéria de causar dano ao hospedeiro) podem estar relacionadas. Considera-se, neste particular, que tanto as defesas do hospedeiro quanto a presença de antimicrobianos sejam condições adversas ao crescimento da maioria das bactérias. Essa adversidade acaba assim por favorecer uma minoria bacteriana resistente e virulenta que, ao sobreviver, ocupa nichos não ocupados pelas demais. Resistência e virulência podem dessa forma, ser considerados mecanismos de adaptação que permitem a sobrevivência dos microorganismos sob condições desfavoráveis. Tais condições, representadas pelo processo infeccioso e pelo tratamento com o antimicrobiano, comportam-se assim como gargalos evolutivos que, ao reduzir a biodiversidade microbiana, possibilitam a sobrevivência e a multiplicação de uma fração restrita de bactérias. Em situações de terapia antimicrobiana, as bactérias virulentas que possuírem também genes de resistência, poderiam se multiplicar por exclusão das sensíveis. Na presença de condições predisponentes dos hospedeiros, como na imunossupressão, essas bactérias deixariam seu reservatório inicial para atingir em grande número outros tecidos do organismo, causando infecções ainda mais graves (ALMEIDA; PALERMO-NETO, 2005).

2.3 Propriedades Bioquímicas de *Salmonella*

Os microorganismos, como todos os seres vivos podem, até certo ponto, modificar o meio em que se encontram e utilizar as soluções químicas como fontes de energia, produzindo um ambiente propício para seu crescimento e reprodução. Todas as atividades celulares são mediadas

por enzimas e os microorganismos produzem diversos tipos de enzimas que atuam de forma interligada. Ao testar os produtos finais de reações enzimáticas e notar o desaparecimento de algumas substâncias de um meio de cultura, os microbiologistas podem estabelecer as características enzimáticas de um microorganismo e identificá-lo, podendo então diferenciá-lo de espécies similares (SEELEY JR et al., 1991).

A caracterização bioquímica das *Salmonella* é dividida em caracterização bioquímica preliminar e caracterização bioquímica complementar. Os testes bioquímicos preliminares baseiam-se em propriedades fisiológicas e metabólicas das culturas suspeitas através da verificação da presença de citocromo oxidase, fermentação da glicose, lactose e sacarose (Ágar TSI - *Triple Sugar Iron*), descarboxilação da lisina (Ágar Lisina LIA – *Lysine Iron Agar*), produção de gás sulfídrico (H_2S), indol, motilidade e produção de urease. Por sua vez, os testes complementares baseiam-se em outras propriedades metabólicas das culturas suspeitas. São realizados através da verificação da utilização do citrato e do malonato como única fonte de carbono, fermentação do manitol, sacarose, glicose, lactose, maltose e dulcitol; descarboxilação da ornitina e lisina, desidrolação da arginina, desaminação da fenilalanina, e verificação da habilidade em formar produtos finais neutros e/ou manter produtos ácidos finais estáveis a partir da fermentação da glicose (MACFADDIN, 2000).

2.3.1 Testes Utilizados na Caracterização Bioquímica das *Salmonella*

2.3.1.1 Provas da Oxidase e Catalase

A prova de oxidase tem por objetivo determinar a presença da enzima oxidase. Bastante usada para diferenciar as bactérias pertencentes à família *Pseudomonaceae* das pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. Já a catalase é produzida por muitos microrganismos e é usualmente empregada para diferenciar *Staphylococcus*, que são catalase positivos d*e Streptococcus*, catalase negativos. Esta enzima atua sobre a água oxigenada (peróxido de hidrogênio 3 a 5%) desdobrando-a em oxigênio e água (MACFADDIN, 2000).

2.3.1.2 Utilização de fontes de Carboidratos

Os testes de fermentação de carboidratos são realizados para determinar a habilidade de um organismo fermentar, ou seja, degradar determinado carboidrato, incorporado a um meio basal, tendo como resultado a produção de ácido ou ácido e gás. Os padrões de fermentação são característicos de grupos de bactérias ou espécies, como por exemplo, todas as *Enterobacteriaceae* são fermentadoras de glicose. Os testes de fermentação de carboidratos podem ser úteis na diferenciação entre gêneros e pode auxiliar na identificação de espécies bacterianas (MACFADDIN, 2000).

Assim como os humanos, a maioria dos microorganismos utiliza inúmeros carboidratos como sua fonte principal de energia. Estes incluem os polissacarídeos (salicina e dextrina), os dissacarídeos (lactose, melibiose e sacarose), os trissacarídeos (rafinose) e os monossacarídeos (glicose, ramnose, adonitol, dulcitol, manitol e sorbitol) (SEELEY JR et al., 1991). Os carboidratos são chamados de açúcares, entretanto, alguns deles são na verdade álcoois. Normalmente, um açúcar "verdadeiro" tem seu nome terminado com "ose", enquanto os álcoois terminam com "ol". Poucas exceções existem em relação a estas nomenclaturas, sendo uma delas o açúcar salicina (MACFADDIN, 2000).

2.3.1.3 Utilização de fontes de Aminoácidos e Deaminação da Fenilalanina

Os aminoácidos, além de servirem como constituintes primários de várias proteínas que compõem os organismos vivos, também são utilizados pelas células com outros objetivos, pois podem ser degradados gerando energia e outros produtos finais, como amônia (NH_3), indol e H_20. Segundo MacFaddin (2000), os testes de descarboxilase, que utilizam os aminoácidos lisina, arginina e ornitina, são utilizados para verificar a habilidade enzimática de um organismo em descarboxilar um aminoácido e formar uma amina, resultando em alcalinidade, já que as aminas são básicas.

O teste da deaminação da fenilalanina consiste em colocar a amostra a ser testada em um meio de cultura que contenha entre outros compostos, o aminoácido fenilalanina. Após a

incubação, se ocorrer a deaminação da fenilalanina, será possível detectar seu produto, o ácido fenilpirúvico, através da formação de um complexo de cor verde ao administrar uma solução de cloreto férrico ao longo do local onde a amostra foi inoculada (BARON; FINEGOLD, 1990).

2.3.1.4 Utilização de Citrato e Malonato

O teste realizado com o citrato e com o malonato serve para determinar se um organismo é capaz de utilizar somente o citrato ou somente o malonato de sódio como única fonte de carbono para seu metabolismo e crescimento. O Citrato de Simmon's (citrato de sódio como fonte de carbono) é um dos meios de cultura que são utilizados para a realização deste teste em laboratórios de microbiologia (MACFADDIN, 2000).

2.3.1.5 Produção de Urease, H_2S, Motilidade e Indol

A presença da enzima urease também se caracteriza numa forma de diferenciação entre os microorganismos. O teste consiste em verificar se um microorganismo produz a enzima urease, cuja função é degradar a uréia, transformando-a em duas moléculas de amônia, provocando a alcalinização do meio.

Os testes de motilidade, produção de indol e H_2S podem ser realizados no meio de cultura denominado ágar SIM (*Sulfide Indole Motility*). A produção de H_2S é visualizada através de uma reação onde o local de inoculação ficará preto. No caso de uma bactéria móvel, a coloração enegrecida poderá se espalhar por todo o meio. Já a produção de indol é detectada através da utilização de um reagente, que ao combinar-se com o indol, gera uma reação química que resulta em mudança de cor, e formação de um anel rosa. Um dos reagentes que pode ser utilizado neste teste é o reativo de Kovac's, que deve ser acrescentado ao meio onde o microrganismo foi inoculado (MACFADDIN, 2000).

2.4 Fatores Associados à Virulência de *Salmonella*

Estudos realizados na década passada, com base na virulência genética da *Salmonella*, têm um significado avançado no entendimento da interação bactéria-hospedeiro, mas ainda existem várias questões a serem respondidas (DARWIN; MILLER, 1999).

A habilidade das *Salmonella* em causar doenças depende de vários fatores de virulência determinantes. Alguns desses fatores são chamados de "clássicos e podem estar localizados em elementos genéticos transmissíveis, como *transposons*, plasmídeos ou bacteriófagos, assim como fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, as chamadas Ilhas de Patogenicidade (IP), locais que agrupam a maioria dos genes de virulência (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

Alguns destes fatores podem ser considerados como virulentos em um amplo sentido. O número de genes chamados de "genes de virulência" depende da definição usada. Por exemplo, genes envolvidos com a captação e biosíntese de nutrientes, resposta ao estresse dentro e fora do hospedeiro e genes de reparação de lesões celulares são alguns desses. Esses genes podem ser considerados "genes de subsistência" e estão presentes em outras bactérias relatadas, como a *E. coli*, mas podem também ser chamados de genes de virulência quando a sua inativação resulta em atenuação da virulência da bactéria. Outra definição de genes de virulência diz que, para ser considerado um gene de virulência, este tem que estar ausente em bactérias que são consideradas não patogênicas, mas se essa hipótese for tomada como verdadeira, os genes LPS não podem ser considerados fatores de virulência, afinal estão presentes em ambas as classes de bactéria, patogênicas e não patogênicas. Assim, as propriedades das bactérias patogênicas que são necessárias para sobreviver, multiplicar e causar dano ao seu hospedeiro são: a capacidade de competir com outras bactérias no hospedeiro; se estabelecer dentro de hospedeiro específico; debelar os mecanismos de defesa do hospedeiro; multiplicar-se depois de estabelecida e durante este processo causar danos no hospedeiro (WASSENAAR; GAASTRA, 2001).

Cada patógeno possui um diverso e único *set* de genes que permite a ele causar doença. Concentrar-se no papel de cada um desses genes individualmente é essencial para entender o complexo mecanismo por trás da doença. Todo microrganismo envolvido em uma estratégia patogênica combina um ou mais mecanismos que operam em um conjunto de ações. Entender a

dinâmica de vida das bactérias patogênicas e não patogênicas pode ajudar a identificar os genes relevantes para a sua patogenicidade (WASSENAAR; GAASTRA, 2001).

2.4.1 Patogenicidade e genes de virulência

A *Salmonella* é um patógeno intracelular facultativo, que dependendo do seu sorotipo e hospedeiro pode causar doenças. Como microorganismo intracelular facultativo, há a exigência de um grande número de genes para que possa ser determinadora doença (GROISMAN; OCHMAN 1997). É estimado que na *S.* Typhimurium aproximadamente 4% do seu genoma, traduzidos em mais de 200 genes de virulência, seja requerido para que ela possa causar infecções fatais em ratos. Além disso, a sobrevivência da bactéria no hospedeiro depende de um delicado balanço entre vários produtos gênicos atuando no tempo certo e no local correto (BOWE et al., 1998).

Esses genes são encontrados em plasmídios ou dentro de cromossomos como unidades únicas, em conjuntos de poucos genes, pequenas ilhas ou extensos cassetes genéticos compostos por uma série de genes e *operons* (Ilhas de Patogenicidade) (MARCUS et al., 2000).

2.4.1.1 Genes cromossomais

2.4.1.1.1 Fímbrias e Genes fimbriais

Antes de invadir qualquer tipo de célula, as enterobactérias necessitam entrar em contato e se fixar a um ou mais tipos celulares encontrados no tecido intestinal. A fixação à célula do hospedeiro é essencial para a patogenicidade da bactéria, sendo este evento mediado principalmente pelas fímbrias. Desta forma as fímbrias exercem um importante fator na interação bactéria-hospedeiro. Além disso, as fímbrias têm um papel fundamental na adesão às superfícies, persistência ambiental e formação de biofilmes (CLOUTHIER et al., 1993; GIBSON et al., 2007). Tal tropismo pode envolver vários tipos de fimbrias ou *pili* e quatro deles têm sido

descritos geneticamente. Elas incluem as fímbrias do tipo I (Fim), fímbrias codificadas por plasmídios (PEF), fímbria polar longa (LPF) e fímbrias agregativas (AGF) (DARWIN; MILLER, 1999). Alguns estudos sugerem que cada uma destas fímbrias tenha um tropismo específico por algum tipo celular ou pelas células de uma espécie animal em particular (BÄUMLER et al., 1996a). Similar a outras bactérias patogênicas, as *Salmonella* produzem fímbrias, que são compostas por proteínas estruturais de uma única espécie, arranjadas de uma forma helicoidal e tendo cada uma em torno de 2 a 7 nm de largura (PARANCHYCH; FROST 1988, TORTORA, et al., 2000) .

Em *Salmonella* já foram identificados 20 *operons* fimbriais, além do *operon* da fímbria tipo IV. Entre os *operons* fimbriais *Salmonella* - específicos está o *lpf*; a fímbria produzida por este operon é mais longa do que as outras fímbrias elaboradas e polarmente localizada na célula bacteriana. O gene *lpf*A codifica a maior subunidade da fímbria (está inserido no lócus *lpf*ABCDE), sendo que os genes fimbriais *lpf* completos, parecem estar presentes somente em algumas sorovares de *Salmonella* subespécie *entericas* e *S. bongori*. Provavelmente a fímbria polar esteja envolvida no tropismo pelas placas de Peyer's em intestinos de ratos (BAÜMLER et al., 1996a). Outra função que tem sido atribuída ao gene *lpf*A é a de conferir imunidade cruzada entre os sorotipos de *Salmonella* (BÄUMLER et al., 1996 (b); NORRIS; BÄUMLER, 1999).

Outro *operon* envolvido na codificação de fímbrias é o *agf*, o qual codifica a fímbria SEF17 ou Tafi (*thin aggregative fimbriae*) que é essencial para formação da matriz extracelular, a qual esta envolvida em agregação multicelular (agregação bacteriana), formação de biofilme, resistência ambiental, aderência e invasão em células eucarióticas e também exerce papel pró – inflamatório (GIBSON et al., 2007).

O papel dos *operons* fimbriais na virulência de infecção por *Salmonella* em suínos, bovinos ou frangos não está completamente estabelecido, porém devido ao grande número de *operons* fimbriais existentes pode ser sugerido que a bactéria apresenta diferentes mecanismos de aderência quando em diferentes hospedeiros (LIBBY et al., 2004).

2.4.1.1.2 Ilhas de Patogenicidade (IPs) e Genes de Invasão Celular

As *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPIs) são definidas como extensos cassetes genéticos dentro do cromossomo da *Salmonella* responsável por codificar substâncias responsáveis pelo estabelecimento de interações específicas com o hospedeiro e também necessárias para a virulência bacteriana em um dado modelo animal (MARCUS et al., 2000). Foi descrito que esses cassetes genéticos foram adquiridos pela *Salmonella* de outras espécies por transferência horizontal. Essa hipótese é baseada na significante diferença na quantidade de GC contidas nestas Ilhas, comparadas com o genoma residual e as sobras de bacteriófagos ou nas sequencias de *transposons* inseridos que marcam as bordas dessas Ilhas (GROISMAN; OCHMAN, 1996).

Um total de 10 Ilhas de Patogenicidade (IP) foi descrito em *Salmonella* até o momento (BHUNIA, 2008). O fenótipo invasivo é determinado por um grande *set* de genes localizados na IP1, os quais estão presentes em todas as cepas invasivas de *Salmonella* (MILLS et al., 1995). A IP1 é a mais bem caracterizada geneticamente entre as 10 IPs descritas. Ela contém pelo menos 29 genes que sintetizam vários componentes do sistema de secreção tipo III (COLLAZO; GALAN, 1997). A IP1 encontra-se presente em *Salmonella bongori* e em todas as espécies das *Salmonella enterica* e os *operons Inv* (*invasibility*) e *Hil* (*hiper invasibility*) estão presentes nesta ilha, em meio a outros genes e proteínas (MARCUS et al., 2000).

A invasão é um importante fator que influencia na virulência da *Salmonella*. O *operon inv*ABC de diferentes sorovares de salmonela teve um papel importante na invasão de células epiteliais em cultivo (GALAN; CURTISS, 1991). O gene *inv*A é o primeiro no *operon*, onde os genes *inv*A, B e C estão arranjados na mesma unidade transcricional e o gene i*nv*D está localizado em uma unidade transcricional diferente (GALAN et al., 1992). O gene *inv*A foi detectado em 630 amostras de salmonela pertencentes a 100 sorovares diferentes, (RAHN et al., 1992) e parece ser conservado em todos os sorovares de *Salmonella*, sendo considerado o gene alvo para a detecção desta bactéria pela técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) (WHANG et al., 2009).

Estudos demonstraram que a *Salmonella* Typhimurium tem como célula alvo, para entrada no epitélio intestinal de camundongos, a célula M, e que é necessária a presença do gene

*inv*A para uma eficiente invasão dessas células (CLARK et al., 1998). É inferido que o gene *inv*A é o responsável por inicializar o processo de internalização da *S.* Typhimurium em cultura de células epiteliais. Mutações dentro desse operon (*inv*) deixaram a *Salmonella* incapaz de invadir as células MDCK *in vitro* (GALAN; CURTISS, 1989). Outro importante influenciador da invasibilidade das *Salmonella* é o Sistema de Secreção tipo III (SSTT) (WALLIS; GALYOV, 2000). O SSTT é codificado por alguns genes, inclusive o *inv*A, e estes sistemas são responsáveis pela secreção de proteínas bacterianas que promovem a entrada da bactéria para o interior das células alvo.

O gene *hil*A (*Hiper Invasibility*) é um regulador de uma variedade de genes relacionados a invasão celular. A invasão das células epiteliais e a indução de apoptose pelos macrófagos são absolutamente dependente deste gene (BAJAJ et al., 1995), sendo assim o gene *hil*A é o mais importante regulador do processo de invasão celular (VAN IMMERSEEL et al., 2008). Não se sabe exatamente o que promove a ativação do *hil*A, no entanto, parece que ele se liga diretamente aos promotores *inv*F e *prg*H, ativando o sistema de secreção do tipo III e ativando o gene *inv*F, responsável pela ativação da IP1 e seus efetores e também os genes que regulam a atividade da IP-4 (KEERSMAECKER et al., 2005). Sabe-se que sua expressão é afetada pelos sinais ambientais externos, como tensão de oxigênio, osmolaridade, pH e nutrientes, sinais estes que estimulam a invasibilidade da *Salmonella* (BAJAJ et al., 1996).

O SSTT III é um mecanismo de virulência compartilhado entre várias bactérias gram negativas (CORNELIS, 2006). Sua função é levar proteínas da bactéria para o citoplasma da célula hospedeira, onde elas sequestram processos sinalizadores e reorganizam a actina facilitando o processo de endocitose da bactéria (GALAN; ZHOU, 2000). O SSTT é uma máquina molecular complexa, que requer mais de 40 genes efetores, estruturais e chaperonas, muito dos quais estão inseridos em ilhas genômicas (GROISMAN; OCHMAN 1996). Uma rede regulatória interna controla quando e onde cada um desses genes será expresso (LUCAS; LEE, 2000).

A proteína AvrA (*Avirulence*) é uma das proteínas efetoras produzidas pelo SSTT III. O gene *avr*A está localizado na IP1 e está relacionado com a indução de apoptose celular e também com a resposta inflamatória do hospedeiro. Sob condições normais de cultura *in vitro*, a proteína AvrA não é produzida de forma abundante e pode ser visualizada apenas pela expressão do gene

*avr*A em clones plasmidiais de bactérias de campo ou análises por *imunoblot* (HARDT; GALAN, 1997). O carreamento do gene *avr*A para dentro das células hospedeiras tem sido demonstrado, no entanto a deleção desse gene não afetou de forma efetiva nem a invasão celular *in vitro* nem a patogênese da *S.* Typhimurium em ratos, e sua função permanece indefinida (ZHANG et al., 2002).

Já as proteínas Sop (*Salmonella Outer Protein*) são codificadas pelos genes *sop*. O principal deles é o gene *sop*E , que contribui para a invasão da *Salmonella* através da estímulo de deformações na membrana celular (MIRMOMENI et al., 2008). É crucial para a invasão celular o rearranjo do citoesqueleto de actina da célula hospedeira, devido à capacidade de as citocalasinas inibirem a entrada das *Salmonella* nas células do hospedeiro (FINLAY et al., 1991). Nota-se que a invasão da *Salmonella* é tanto morfologicamente quanto bioquimicamente mediada por receptores de fagocitose produzidos por fagócitos profissionais, por isso é importante que a invasão seja mediada pela translocação de substâncias efetoras que se liguem diretamente a marcadores das vias de entrada das células hospedeiras (BRUMELL et al., 1999). Depois de ser levada para dentro da célula hospedeira, a proteína SopE ativa diretamente o sistema Cdc42 e Rac, esses sistemas iniciam uma variedade de sinais em cascata que levam a um rearranjo do citoesqueleto de actina e a produção de citosinas pré inflamatórias que facilitam a entrada da bactéria (GALAN, 1999).

2.4.1.2 Plasmídeos e Genes Plasmidiais

Os plasmídeos de virulência são um dos vários determinantes de virulência da *Salmonella*, estão envolvidos com a sua sobrevivência e crescimento nas células hospedeiras. É sugerido que os plasmídeos de virulência não estejam envolvidos na interação inicial entre as *Salmonella* e a mucosa intestinal, e tampouco são requeridos para a invasão dos tecidos. No entanto, eles permitem que o microorganismo persista nas células reticuloendoteliais do fígado e baço (FINLAY; FALKOW, 1989). Pelo menos seis sorotipos de *Salmonella* (Abortusovis, Colerasuis, Dublin, Enteritidis, *Gallinarum*/*Pullorum*, e Typhimurium) reconhecidamente possuem plasmídeos, no entanto não são todos os isolados desses sorotipos que carregam esses componentes genéticos (ROTGER; CASADESUS, 1999). Vários estudos genotípicos mostraram

que muito da variação que existe entre os sorovares de *Salmonella enterica*, assim como cepas dentro do mesmo sorovar, é devido à presença ou ausência de DNAs “móveis”, assim como os plasmídeos (MATIASOVICOVA et al., 2007). As contribuições dos plasmídeos com a virulência dos sorovares de *Salmonella enterica* têm sido feitas por quase 20 anos (WOODWARD et al., 1989).

Os genes mais importantes localizados em plasmídeos das *Salmonella enterica* são os genes *spv*, os quais contribuem para a colonização de órgãos como baço e fígado. A presença dos genes *spv* (*Salmonella Plasmid Virulence*) é comum a todos os plasmídeos. A região *spv* abriga cinco genes, *spv*R*ABCD*, organizados em um *regulon* conservado entre os sorovares. A síntese e localização de proteínas codificadas pelos quatro genes estruturais (*spvABCD*) têm sido estudadas com o uso anticorpos específicos. Esses genes estão associados com os sorovares mais invasivos de *Salmonella* como, *S.* Typhimurium, *S.* Dublin, *S.* Enteritidis, *S. Gallinarum* ou *S.* Colerasuis (WOODWARD et al., 1989).

O gene *spv*C é encontrado somente no citoplasma celular, e sua função não está completamente compreendida. No entanto, ele parece aumentar a taxa de crescimento da *Salmonella* dentro da célula infectada e afetar a sua interação com o sistema imune do hospedeiro (GULIG et al., 1993). Experimentos têm demonstrado que os genes *spv*B e *spv*C são suficientes para conferir virulência a *S.* Typhimurium quando administradas subcutaneamente em ratos (MATSUI et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODO

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sendo realizado em duas etapas. A primeira consistiu na padronização de sete protocolos de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) para genes associados à virulência em *Salmonella* sp. A segunda etapa foi a pesquisa desses genes em amostras de *Salmonella* Hadar, nas quais também foram traçados os perfis bioquímicos e de resistência a antimicrobianos.

3.1 Padronização dos Protocolos de PCR

Neste trabalho foram pesquisados sete genes de virulência relacionados com a patogenicidade de *Salmonella* sp. Os sete genes pesquisados estão relacionados com as fases de adesão, invasão e consequente lesão em células intestinais de aves. O protocolo utilizado para cada um dos genes pesquisados foi desenvolvido com base em trabalhos anteriores, sendo suas condições de reação testadas e adaptadas quando necessário. Os genes pesquisados bem como os trabalhos utilizados para o desenvolvimento dos protocolos estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Genes a serem pesquisados, localização genética, tamanho de *amplicom* (PB) e trabalhos de referência.

Genes	***Localização Genética***	**PB**	**Referências**
*agf*A	*Operon* Fimbrial *agf*	350	Doran et al. (1993)
*avr*A	Ilha de Patogenicidade 1 (IP1)	385	Prager et al. (2003)
*hil*A	Ilha de Patogenicidade 1 (IP1)	497	Guo et al. (2000)
*inv*A	Ilha de Patogenicidade 1 (IP1)	284	Oliveira et al. (2003)
*lpf*A	*Operon* Fimbrial *lpf*	250	Heuzenroeder et al. (2001)
*sop*E	Ilha de Patogenicidade 1 (IP1)	398	Prager et al. (2003)
*spv*C	Plasmídeos	669	Castilla et al. (2006)

PB: pares de bases

3.1.2 Realização dos Testes de PCR

Para a realização das análises foram utilizadas amostras de enterobactérias como controles positivos e negativos. Na Tabela 2 estão descritas as bactérias utilizadas como controles em cada um dos protocolos testados.

Tabela 2: Controles positivos e negativos utilizados nas reações de PCR para cada gene.

Genes	Controles Positivos	Controles Negativos
***agf*A**	*Salmonella* Tiphymurium – CCDPA20	*Proteus vulgaris* - ATCC 13345
***avr*A**	*Salmonella* Tiphymurium – CCDPA7	*Crysiomonas* sp.- CCDPA8
***hil*A**	*Salmonella* Tiphymurium – CCDPA20	*Proteus vulgaris* - ATCC 13345
***inv*A**	*Salmonella* Enteritidis – CCDPA8	*Crysiomonas* sp - CCDPA8
***lpf*A**	*Salmonella* Tiphymurium – CCDPA20	*Crysiomonas* sp. - CCDPA8
***sop*E**	*Salmonella* Tiphymurium – CCDPA7	*Pasteurella multocida* - CCDPA33
***spv*C**	*Salmonella* Tiphymurium – CCDPA20	*Crysiomonas* sp. - CCDPA8

ATCC - *American Type Culture Collection*; CCDPA – Coleção CDPA

As bactérias utilizadas, que estavam estocadas em ágar estoque na bacterioteca do CDPA, foram reativadas em caldo de enriquecimento, e em seguida passadas para os ágares mais adequados a cada uma. Em seguida foram selecionadas colônias puras para a extração do DNA, que foi feita a partir do método de extração por calor descrito por Borsoi et al. (2009), a qual é realizada a partir de centrifugações das alíquotas, seguidas de lavagem das mesmas e obtenção do DNA por lise das células bacterianas em banho-maria a 100ºC. Os DNAs extraídos foram armazenados em temperatura de -20C° e utilizados sempre que necessário. Em seguida um a um os protocolos foram sendo testados seguindo as condições de reação e os ciclos de termociclador específicos para cada um. Quando necessário faziam-se adaptações nos protocolos para que se chegasse a uma melhor condição de leitura de seus produtos. Alterações foram feitas nos protocolos, principalmente nas concentrações de Cloreto de Magnésio ($Mgcl_2$), dNTPs e *Primers*, e também na temperatura de anelamento. Todos os resultados, separadamente, foram analisados por eletroforese em gel de agarose seguida de leitura em transluminador UV (Ultra Violeta).

3.2 Pesquisa de Genes de Virulência, Perfis Bioquímico e Antimicrobiano em *Salmonella* Hadar.

3.2.1 Amostras de *Salmonella* Hadar

Foram analisadas 34 amostras de *Salmonella* Hadar, isoladas a partir de mecônio, carcaças e cortes de frango no Rio Grande do Sul, previamente identificadas no Instituto Oswaldo Cruz, e que estavam estocadas na bacterioteca do CDPA-UFRGS. Além de mais 7 amostras isoladas de suabe de cama de frangos de corte, totalizando 41 amostras (fontes descritas no anexo 1). Todas as amostras foram testadas para os sete genes associados à virulência estudados neste trabalho, além de terem seus perfis bioquímicos e antimicrobianos traçados.

3.2.2 Pesquisa de Genes de Virulência

As 41 amostras se *S*. Hadar que estavam acondicionadas em ágar estoque foram reativadas em meio de enriquecimento não seletivo, caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) por 24 a 37 ºC, em seguida foram inoculadas em caldo Rappaport-Vassiliadis (RV) e incubadas em banho-maria a 42ºC por 24h. Após, as amostras foram estriadas em ágar XLD (*Xylose Lysine Deoxicholate*) e incubadas a 37ºC por 24h, para isolamento das colônias. A partir dado ágar XLD foram selecionadas de 3 a 5 colônias com características compatíveis com as de *Salmonella* e inoculadas em microtubos tipo *eppendorf* contendo 1 mL de caldo BHI, sendo estes então incubados por 24h a 37ºC. A extração do DNA foi realizada a partir desta alíquota de BHI contida nos *eppendorfs*, conforme descrito por Borsoi et al., (2009). O DNA extraído foi armazenado a -20°C em freezer pelo tempo necessário até sua utilização, servindo de molde para a realização dos testes em questão.

Os protocolos de PCR utilizados para cada gene seguiram as condições de reações e temperaturas de termociclador obtidas após a realização de sucessivos testes. Tomando-se por base os trabalhos descritos na Tabela 1, cada protocolo em questão foi adaptado para as condições de uso no laboratório citado testando-se as concentração de Cloreto de Magnésio, *Primers*, dNTP’s (Desoxirribonucleotídeos) bem como a temperatura de anelamento para a reação em termociclador. Todos os testes realizados tiveram os seus produtos analisados por eletroforese em gel de agarose 1,2% seguida de leitura em transluminador UV.

3.2.3 Perfil Bioquímico

Para a realização dos testes bioquímicos as amostras contidas em ágar estoque foram reativadas em caldo de enriquecimento seletivo, RV a 42 ºC por 24 horas, seguindo de inoculação em ágar XLD. Após um crescimento de 24 horas a 37 C° foi selecionada, a partir do Agar XLD, uma colônia isolada com característica de *Salmonella* para a realização das provas bioquímicas.

As provas bioquímicas foram realizadas de acordo com os procedimentos preconizados pela NCCLS (*National Comittee for Clinical Laboratory Standrts)* 2005. Os testes realizados bem como os resultados esperados para as para as *Salmonella* paratíficas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Bioquímicos utilizados, região/produto a serem avaliados em cada meio testado e resultados esperados para as *Salmonella* paratíficas.

Bioquímicos	Região/Produto de Avaliação	*Salmonella* sp.
TSI	Base	Ácida
	Bisel	Alcalino
	H_2S	Positivo
	Gás	Positivo
LIA	Base	Alcalina
	Bisel	Alcalino
	H_2S	Positivo
SIM	H_2S	Positivo
	Motilidade	Positiva
	Indol	Negativo
URÉIA		Negativa
CITRATO		Positivo
MANITOL		Positivo
SACAROSE		Negativo
GLICOSE	Acidez	Positiva
	Gás	Positivo
LACTOSE		Negativa
MALTOSE		Positivo
DULCITOL		Variável
ORNITINA		Positivo
ARGININA		Variável
LISINA		Negativo
MALONATO		Negativo
CLARK LUBS	VM	Positivo
	VP	Negativo
FENILALANINA	Cloreto Férrico	Negativo

VM= Vermelho de Metila; VP = Voges-Proskauer

3.2.3.1 Controles dos bioquímicos

Após a preparação dos meios de cultura, conforme manual do fabricante, todos os tubos passaram por controle de esterilidade, sendo incubados por 24 horas a 37C° antes de serem utilizados.

Foram utilizados controles positivos e negativos para verificar a funcionabilidade dos meios. Como controles positivos foram usadas culturas bacterianas específicas (Tabela 4), as

quais apresentam resultado conhecidamente positivo para cada teste bioquímico utilizado. Como controle negativo, uma bateria de testes bioquímicos não inoculados foi incubada concomitantemente aos testes a fim de analisar resultado negativo e comparar no momento da leitura.

Tabela 4: Bactérias utilizadas como controles positivos e seus respectivos testes bioquímicos.

Bioquímicos	Região/Produto de Avaliação	Bactéria Controle
TSI	Base Bisel H_2S Gás	*Salmonella* Tiphymurium
LIA	Base Bisel H_2S	*Salmonella* Tiphymurium
SIM	H_2S Motilidade Indol	Proteus sp.
URÉIA		Proteus sp.
CITRATO		*Salmonella* Tiphymurium
MANITOL		*Salmonella* Tiphymurium
SACAROSE		Citrobacter
GLICOSE	Acidez Gás	*Salmonella* Tiphymurium
LACTOSE		Citrobacter
MALTOSE		*Salmonella* Tiphymurium
DULCITOL		Citrobacter
ORNITINA		*Salmonella* Tiphymurium
ARGININA		Pseudomonas sp.
LISINA		*Salmonella* Tiphymurium
MALONATO		Klebsiela sp.
CLARK LUBS	VM VP	*Salmonella* Tiphymurium Klebsiela sp.
FENILALANINA	Cloreto Férrico	Proteus sp.

VM= Vermelho de Metila; VP = Voges-Proskauer

3.2.4 Perfil de resistência a Antimicrobianos

Os testes para caracterização do perfil de resistência a antimicrobianos foram realizados a partir da técnica de difusão em ágar Müeller Hinton (MH), utilizando de discos de papel filtro impregnados com antimicrobianos.

Para a realização dos testes com antimicrobianos as amostras foram reativadas em caldo cérebro-coração, incubadas a 37ºC por 18-24h e posteriormente passadas para caldo RV, incubado banho-maria a 42 ºC por 18-24h. Após, as amostras foram estriadas em ágar verde brilhante (BGN) e XLD e incubadas novamente a 37 ºC por 18-24h. Posteriormente, uma colônia isolada de cada amostra foi estriada em ágar cérebro-coração (BHA) e incubada a 37 ºC por 18-24h. Para realização do antibiograma, foram colhidas colônias isoladas do ágar BHA e diluídas em solução salina 0,85%, até a concentração compatível com 0,5 na escala de McFarland. A partir desta diluição foram semeados, com alça de *Drigalski*, 150 µL da cultura em placas de ágar Müeller Hinton (MH) com diâmetro de 12 cm. Sobre a cultura estriada em Agar MH, os discos impregnados com antimicrobianos foram distribuídos, sendo este procedimento realizado em capela de fluxo laminar vertical. As placas foram incubadas a 37 °C e a leitura do diâmetro dos halos foi realizada entre 18-20 h de incubação. Uma amostra de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa de referência.

Os antimicrobianos utilizados, bem como os diâmetros dos halos de resistência, intermediário e de sensibilidade descritos de acordo com a NCCLS estão descritos no anexo 2.

Os antimicrobianos Eritromicina e Lincomicina foram usados como controles para a verificação de não contaminação das amostras, visto que o primeiro não possui ação efetiva contra enterobactérias e o segundo é utilizado especificamente para bactérias gram positivas.

4. RESULTADO

4.1 Padronização dos Protocolos de PCR

As condições finais de reação obtidas para cada gene trabalhado neste estudo estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Condições finais de reagentes e para termociclador para cada gene testado.

Genes	Concentração de Reagentes	Condições de Termociclador
***agf*A**	$MgCl_2$ $2{,}5_{mM}$; dNTPs($2{,}5_{mM}$) $0.2_{\mu l}$; *Primers(* 20_{pmol}) $1_{\mu l}$	94C°, 1seg; 58C°, 1seg; 74C°, 21seg.
***avr*A**	$MgCl_2$ 2_{mM} ; dNTPs($2{,}5_{mM}$) $2_{\mu l}$; *Primers(* 20_{pmol}) $1_{\mu l}$	94C°, 1min; 64C°, 1min; 72C°,1min.
***hil*A**	$MgCl_2$ $1{,}5_{mM}$; dNTPs($2{,}5_{mM}$) $2_{\mu l}$; *Primers(* 20_{pmol}) $1_{\mu l}$	94C°, 2min; 62C°, 1min; 72C°, 1min.
***inv*A**	$MgCl_2$ $2{,}5_{mM}$; dNTPs($2{,}5_{mM}$) $2_{\mu l}$; *Primers(* 20_{pmol}) $1_{\mu l}$	94C°, 1 seg; 55C°,1 seg; 74C°, 1 seg.
***lpf*A**	$MgCl_2$ 4_{mM} ; dNTPs($2{,}5_{mM}$) $2_{\mu l}$; *Primers(* 20_{pmol}) $1_{\mu l}$	94C°, 1seg; 58C°, 1seg; 74C°, 21seg.
***sop*E**	$MgCl_2$ 2_{mM} ; dNTPs($2{,}5_{mM}$) $2_{\mu l}$; *Primers(* 20_{pmol}) $1_{\mu l}$	94C°, 1min; 55C°, 1min; 72C°, 1min.
***spv*C**	$MgCl_2$ 2_{mM} ; dNTPs($2{,}5_{mM}$) $3_{\mu l}$; *Primers(* 20_{pmol}) $3.5_{\mu l}$	93C°, 1min; 42C°, 1min; 72C°, 2min.

4.2 Pesquisa dos Genes de Virulência em amostras *Salmonella* Hadar

Os resultados da pesquisa dos genes associados à virulência nas 41 amostras de *Salmonella* Hadar estão demonstrados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultado da pesquisa de genes associados a virulência nas 41 amostras de *Salmonella* Hadar testadas.

Gene	Positivo		Negativo	
	N° de Amostras	(%)	N° de Amostras	(%)
***agf*A**	41	100	0	0
***avr*A**	7	17.1	34	82.9
***hil*A**	41	100	0	0
***inv*A**	41	100	0	0
***lpf*A**	41	100	0	0
***sop*E**	4	9.7	37	90.3
***spv*C**	0	0	41	100

As Figuras de 1 a 7 exemplificam as leituras em gel de agarose e transluminador UV para cada gene pesquisado nas amostras se *S*. Hadar.

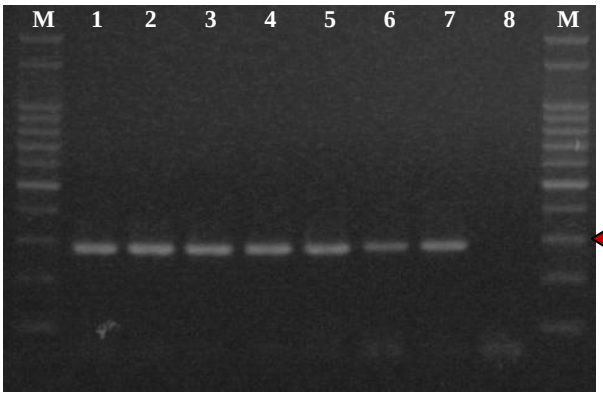

Figura 1: Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *inv*A (284pb). M=Marcador de peso molecular (100pb). Canaletas de 1 a 6, amostras de *S*. Hadar, canaletas 7 e 8 controles positivo e negativo respectivamente. Seta apontando a banda de 300pb do marcador.

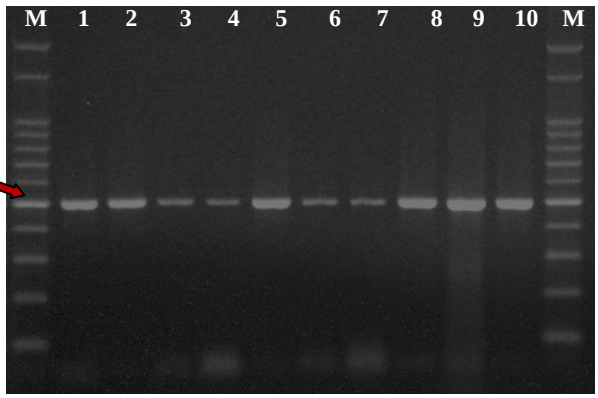

Figura 2: Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *hil*A (497pb). M=Marcador de peso molecular (100pb). Canaletas de 1 a 9, amostras de *S*. Hadar, canaleta 10 controle positivo. Seta apontando a banda de 500pb do marcador.

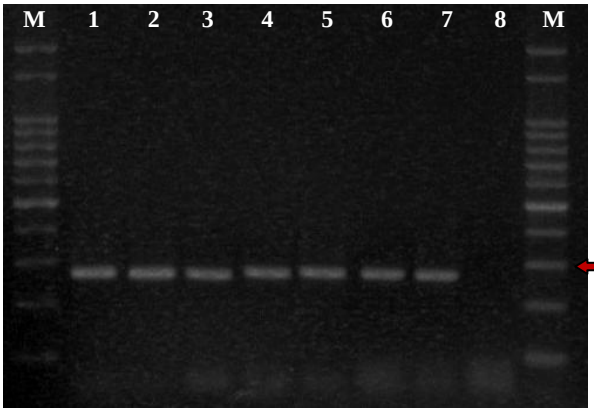

Figura 3: Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *lpf*A (250pb). M=Marcador de peso molecular (100pb). Canaletas de 1 a 6, amostras de *S*. Hadar, canaletas 7 e 8 controles positivo e negativo respectivamente. Seta apontando a banda de 300pb do marcador.

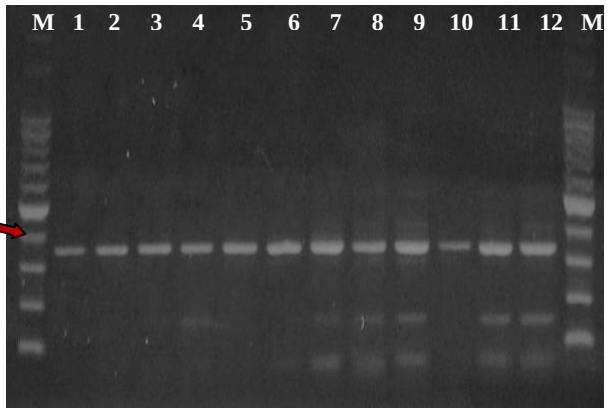

Figura 4: Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *agf*A (350pb). M=Marcador de peso molecular (100pb). Canaletas de 1 a 11, amostras de *S*. Hadar, canaleta 12 controle positivo. Seta apontando a banda de 400pb do marcador.

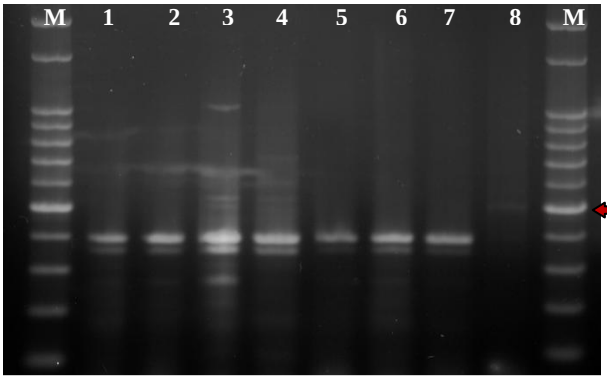

Figura 5: Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *avr*A (385pb). M=Marcador de peso molecular (100pb). Canaletas de 1 a 6, amostras de *S*. Hadar, canaletas 7 e 8 controles positivo e negativo respectivamente. Seta apontando a banda de 400pb do marcador.

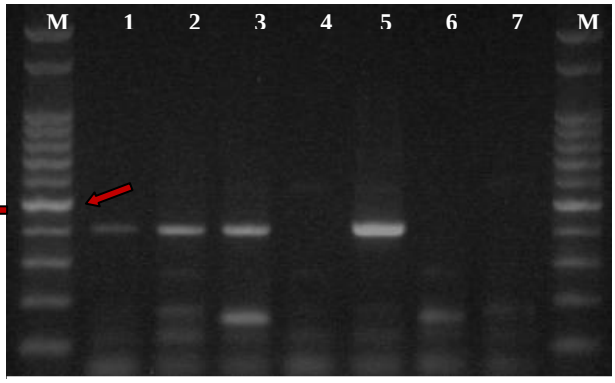

Figura 6: Imagem de gel de agarose 1,2% corados com brometo de etídio com produtos de amplificação compatíveis com o fragmento do gene *sop*E (398pb). M=Marcador de peso molecular (100pb). Canaletas 1 e 7 controles positivo e negativo respectivamente. Canaletas 2, 3 e 5 amostras positivas de S. Hadar. Canaletas 4 e 6 amostras negativas de S. hadar. Seta apontando a banda de 400pb do marcador.

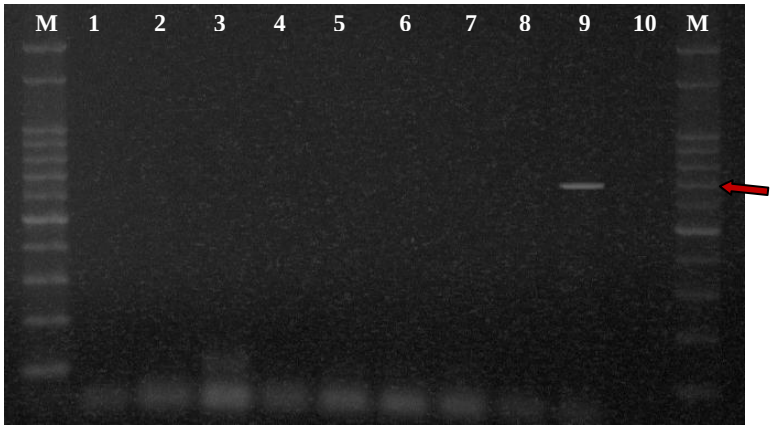

Figura 7: Imagem de gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio com produto de amplificação compatível com o fragmento do gene *spv*C (669pb). M=Marcador de peso molecular (100pb). Canaletas de 1 a 8, amostras negativas de de *S*. Hadar, canaletas 9 e 10 controles positivo e negativo respectivamente. Seta apontando a banda de 700pb do marcador

4.3 Perfil Bioquímico em amostras de *Salmonella* Hadar

Os resultados do perfil bioquímico das 41 amostras de *Salmonella* Hadar envolvidas neste trabalho estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7: Resultado dos testes bioquímicos nas 41 amostras de *Salmonella* Hadar.

Bioquímicos	Região/Produto	*Salmonella* sp.	Positivo/Ácido* (%)	Negativo/Alcalino* (%)
TSI	Base	Ácido	100	0
	Bisel	Alcalino	12.2	87.8
	H2S	Positivo	100	0
	Gás	Positivo	100	0
LIA	Base	Alcalino	0	100
	Bisel	Alcalino	2.44	97.56
	H2S	Positivo	100	0
SIM	H2S	Positivo	100	0
	Motilidade	Positivo	100	0
	Indol	Negativo	0	100
Uréia	-	Negativo	0	100
Citrato	-	Positivo	97.56	2.44
Manitol	-	Positivo	100	0
Sacarose	-	Negativo	0	100
Glicose	Acidez	Positivo	100	0
	Gás	Positivo	100	0
Lactose	-	Negativo	0	100
Maltose	-	Positivo	100	0
Dulcitol	-	Variável	14.64	85.36
Ornitina	-	Positivo	100	0
Arginina	-	Variável	12.20	87.80
Lisina	-	Positivo	100	0
Malonato	-	Negativo	0	100
Clark Lubs	VM	Positivo	100	0
	VP	Negativo	0	100
Fenilalanina	Cloreto Férrico	Negativo	0	100

*Quando a leitura é feita na forma da visualização da acidez ou alcalinidade do meio, considerar as descrições de ÁCIDO ou ALCALINO, no restante das análises considerar o POSITIVO ou NEGATIVO.

As Figuras 8 e 9 ilustram uma bateria de testes bioquímicos antes e após a inoculação com a *Salmonella* Hadar respectivamente.

Figura 8: Bateria de testes bioquímicos não inoculados, da esquerda para direita; Manitol, citrato de simons, uréia, SIM, LIA, TSI.

Figura 9: Bateria de testes bioquímicos inoculados com S. Hadar, após 24 horas de incubação. Da esquerda para direita; maltose, lactose, glicose, sacarose, manitol, citrato de simons, uréia, SIM, LIA, TSI.

4.4 Resistência a antimicrobianos em amostras de *Salmonella* Hadar

Os dados obtidos nos testes com antimicrobianos mostram que todas as cepas foram resistentes a lincomicina e também a eritromicina, o que já era esperado. Um total de 73,17% das cepas apresentou resistência à tetraciclina. Para estreptomicina o percentual foi de 31,70% e ampicilina, 29,27% seguidos por gentamicina e neomicina (19,50%) cada. Com relação à sensibilidade, os antimicrobianos que determinaram maior porcentagem de sensibilidade foram a enrofloxacina (87,80%), amoxicilina (85,36%), sulfametoxazol+trimetropim (82,98%) e Florfenicol e Ciprofloxacina (80,48%) cada.

Os dados com os perfis de resistência aos 14 antimicrobianos analisados nas 41 amostras de *S*. Hadar estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8: Resultado dos perfis de resistência para as 41 amostras de *Salmonella* Hadar testadas.

Perfis de Resistência	Número de Amostras
TET, ERI, LIN	24
TET, EST, ERI, LIN	5
TET, NEO, EST, CIP, AMP, GEN, ERI, LIN	2
TET, NEO, EST, GEN, ERI, LIN	2
ERI, LIN	4
TET, NEO, EST, CIP, NOR, AMP, GEN, FLO, ERI, LIN	1
TET, NEO, EST, CIP, NOR, AMP, GEN, ERI, LIN	1
TET, NOR, ERI, LIN	1
AMP, CFT, ERI, LIN	1

AMP=Ampicilina; AMO=Amoxicilina; CIP=Ciprofloxacina; CFT=Ceftiofur; ERI=Eritromicina; EST=Estreptomicina; FLO=Florfenicol; GEN=Gentamicina; LIN=Lincomicina; NEO=Neomicina; NOR=Norfloxacina; TET=Tetraciclina.

A Figura 10 ilustra uma placa de ágar Müeller Hinton após 20 horas de inoculação em estufa a 37°C com os discos dos 14 antimicrobianos testados.

Figura 10: Antibiograma de *Salmonella* Hadar.

4.5 Relação entre presença de genes, perfil de resistência a antimicrobianos e perfil bioquímico nas amostras de *Salmonella* Hadar

A Tabela 9 apresenta os resultados da pesquisa de genes associados à virulência, resistência a antimicrobianos e testes bioquímicos. Os testes bioquímicos utilizados nesta relação foram aqueles que sabidamente variavam em seus resultados para *Salmonella* sp. (arginina e dulcitol), também foram incluídos outros bioquímicos quando esses apresentaram um resultado diferente do esperado para a *Salmonella* (Tabela 7).

Tabela 9: Relação entre a presença de genes, resistência a antimicrobianos e variação dos testes bioquímicos.

Genes	Resistência a Antimicrobianos		Variação Bioquímica	
	Perfil	**N°Amostras**	**Perfil**	**N°Amostras**
***agf*A, *lpf*A, *inv*A, *hil*A**	TET, LIN, ERI	16	Dulcitol – Neg. Arginina – Neg.	18
	LIN, ERI	4	Dulcitol – Pos. Arginina – Neg.	4
	TET, NEO, EST, CIP, AMP, GEN, ERI, LIN	2	Dulcitol – Neg. Arginina – Pos.	3
	TET, NEO, EST, GEN, ERI, LIN	2	LIA/Bisel – Ac. Dulcitol – Neg. Arginina – Neg.	2
	TET, EST, LIN, ERI	2	TSI/Bisel – Ac. Dulcitol – Neg. Arginina – Neg.	1
	TET, NEO, EST, CIP, NOR, AMP, GEN, FLO, ERI, LIN	1	TSI/Bisel – Ac. Dulcitol – Neg. Arginina – Neg.	1
	TET, NEO, EST, CIP, NOR, AMP, GEN, ERI, LIN	1	Citrato – Neg. Dulcitol – Neg. Arginina – Neg.	1
	TET, NOR, LIN, ERI	1		
	AMP, CFT, LIN, ERI	1		
***agf*A, *lpf*A, *inv*A, *hil*A, *sop*E**	TET, LIN, ERI	2	Dulcitol - Pos. Arginina - Neg.	1
			TSI/Bisel - Ac. Dulcitol - Neg. Arginina - Neg.	1
***agf*A, *lpf*A, *inv*A, *hil*A, *avr*A**	TET, LIN, ERI	5	Dulcitol - Neg. Arginina - Neg.	6
	TET, EST, LIN, ERI	2	Dulcitol - Neg. Arginina - Pos.	1
***agf*A, *lpf*A, *inv*A, *hil*A, *sop*E, *avr*A**	TET, LIN, ERI	1	TSI/Bisel - Ac. Dulcitol - Neg. Arginina - Neg.	1
	TET, EST, LIN, ERI	1	Dulcitol - Neg. Arginina - Neg.	1

5. DISCUSSÃO

Faz parte da política do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) estar sempre buscando inovações que venham a contribuir com a avicultura. Essa política faz com que as pesquisas realizadas pelo laboratório tenham sempre o objetivo de auxiliar os produtores de aves, oferecendo ferramentas práticas que ajudem em tomadas de decisões para questões enfrentadas no dia a dia. Essas ferramentas nada mais são do que mecanismos que fornecem critérios que embasam as decisões a serem tomadas, fazendo com que as medidas tanto profiláticas quanto corretivas a serem realizadas para melhorias no processo de produção sejam mais efetivas e seguras, melhorando assim, tanto o status sanitário de um lote avícola, quanto os padrões zootécnicos buscados por todos que praticam a avicultura, seja ela industrial ou familiar.

O CDPA já dispõe de uma linha de pesquisa que trata sobre a patogenicidade da *Escherichia (E.) coli*, na qual através de Redes Neurais Artificiais (RNA), juntou a biologia molecular e ensaios em vivo, fornecendo assim um novo método de avaliação para o cálculo de índice de patogenicidade em cepas e *E. coli*, utilizando-se de protocolos para a pesquisa de genes associados a virulência desenvolvidos por Rocha, (2006), e também de uma nova metodologia para o cálculo do índice de patogenicidade através da inoculação em pintos de um dia, estabelecido por Souza, (2006). Ainda para *E. coli*, posteriormente, foram traçados o perfil bioquímico e de resistência a antimicrobianos (BORGES, 2008; SALLE, 2009). Dados fornecidos por esses testes contribuem para uma melhor caracterização da bactéria em termos de virulência.

Seguindo a linha de pesquisa do CDPA, iniciando um processo semelhante ao realizado com a *E. coli*, buscou-se neste trabalho dar um início a um programa de identificação que possa caracterizar as cepas com maior patogenicidade de *Salmonella* sp. identificando fatores associados a sua virulência. No entanto para usar o conhecimento a fim de melhor entender o funcionamento de um organismo e assim prevenir ou curar doenças, não basta saber onde os genes específicos se localizam, é preciso saber também como eles funcionam (CAPRA, 2002). Depois de mapear os genomas completos de diversas espécies vegetais e animais, os geneticistas naturalmente voltaram a sua atenção da estrutura dos genes para a sua função e, quando o fizeram, constataram o quanto ainda é limitado o conhecimento do funcionamento dos genes. Em

adição, Keller (2000), cita que os desenvolvimentos mais recentes da biologia molecular nos deram uma nova noção da grandeza do abismo que separa a informação genética do significado biológico, demonstrando assim a necessidade de se avaliar a resposta biológica do hospedeiro frente ao agente patogênico e traçando correlação com a presença ou ausência desses fatores de virulência. Para essa avaliação se faz necessária a realização de ensaios em vivo utilizando-se de bactérias com diferentes perfis de virulência, para que se possa compreender a função que cada elemento genético possui dentro do processo de patogenicidade realizado pelo microrganismo.

Após a realização dos testes com os protocolos de PCR para a pesquisa dos sete genes associados à virulência de *Salmonella* sp., todos os protocolos se mostraram viáveis na identificação dos genes propostos, pois todos amplificaram fragmentos de DNA compatíveis com o segmento dos genes pesquisados. As alterações nos protocolos foram realizadas nas concentrações de reagentes (Cloreto de Magnésio, *primers* e dNTP's principalmente), pois segundo Markoulatos et al., (2002) a otimização do PCR passa pelo acerto das concentrações finais dos reagentes eliminando o aparecimento de produtos não específicos. Para que isso ocorra outro ingrediente fundamental para a perfeita hibridização do *primer* ao DNA alvo é a temperatura de anelamento, a qual também foi testada em cada um dos protocolos até que se obtivesse um resultado final em que fossem visualizados apenas os produtos de reação específicos para cada gene. A temperatura de anelamento deve levar em consideração a temperatura média dos *primers*, e se persistirem produtos secundários ou a amplificação de DNA não ocorrer, esta temperatura deve ser alterada, já que existe uma flexibilidade deste parâmetro permitindo a otimização da reação (HENEGARIU et al., 1997). As condições finais obtidas para cada protocolo estão descritas na Tabela 5. Os indicadores (*primers*) foram específicos para os genes alvo, já que não houve amplificação nas amostras que estavam sendo utilizadas como controles negativos e após testes sucessivos os protocolos apresentaram uma reprodutibilidade desejável, apresentando consistência em seus resultados, podendo ser usados na rotina de pesquisa dos genes propostos.

Com relação à pesquisa dos genes associados à virulência nas amostras de *Salmonella* (*S.*) Hadar, considerando os genes utilizados neste trabalho, as amostras testadas apresentaram um perfil semelhante entre si. Variações aconteceram apenas nos genes *sop*E e *avr*A. Para o gene *spv*C, todas as amostras testadas tiveram resultados negativos, enquanto que para os outros genes testados (*lpf*A, *agf*A, *hil*A e *inv*A) todas amostras apresentaram resultados positivos. A distinção

entre patogênico e não patogênico ainda não está bem nítida e a linha entre os genes de virulência e os outros genes ainda não está bem esclarecida. No que diz respeito à definição dos genes de virulência, é importante considerar o estilo de vida do microorganismo, com ênfase na probabilidade desse organismo causar doença ao hospedeiro (WASSENAAR; GASTRA, 2001). Particularizando-se o estilo de vida da *Salmonella* (intracelular facultativo), os genes relacionados à sua adesão e invasão estão diretamente ligados a sua patogenicidade, assim a presença destes em seu genoma, indica que a bactéria possui a capacidade de causar doenças (GROISMAN; OCHMAN 1997).

Ao contrário das outras *Salmonella* paratíficas ou zoonóticas, a *S.* Hadar não é considerada invasiva pelo Conselho de Zoonoses da União Européia, Diretriz 92/117/EEC. No entanto, ela já foi isolada de órgãos de aves (DESMIDT et al., 1998). A presença dos genes *lpf*A, *agf*A, *hil*A e *inv*A, no genoma da *S.* Hadar, mostra que a mesma possui o maquinário necessário para aderir e iniciar o processo de invasão celular, afirmando que ela possui a capacidade invasiva (DARWIN; MILLER, 1999). Os genes *sop*E e *avr*A foram encontrados em algumas das cepas testadas, essa variação concorda com os resultados obtidos por Prager et al. (2003) e Mirold et al. (2001). A presença desses dois genes pode indicar um aumento na capacidade invasiva da *S.* Hadar, no entanto a ausência deles no genoma da bactéria não faz com que a bactéria possa ser considerada não patogênica, pois até o momento não se conhece de maneira satisfatória as suas funções no mecanismo de patogenicidade, ou se possuem outros mecanismos compensatórios nas suas ausências (SCHIMDT; HENSEL, 2004).

Para o gene *spv*C todas as amostras de *S.* Hadar testadas no presente trabalho foram negativas. Os resultados encontrados concordam com os de Weide-Botjes et al. (1998) que pesquisaram a presença do gene *spv*C em amostras de *S.* Hadar isoladas de casos de diarréia em humanos, cães, gatos e suínos e também de produtos de origem avícola, onde todas as amostras mostraram-se negativas para a presença do gene. No trabalho desenvolvido por Del Cerro et al., (2003) também não houve a detecção dos genes *spv*A, *spv*B e *spv*C pesquisados em 62 amostras de *S.* Hadar isoladas de animais. É sabido que alguns sorovares de *Salmonella* são portadores de plasmídeos de virulência (Typhimurium, Enteritidis, Dublin, *Pullorum*/*Gallinarum*, Cholerasuis e Abortovírus) (VAN-ASTEN; VAN DIJK, 2005) enquanto outros, como a *S.* Hadar não apresentam plasmídeos naturalmente (IMRE et al., 2006). No entanto segundo Valdezate et al.

(2000), as bactérias podem adquirir plasmídeos, principalmente pelo processo de conjugação, ou perdê-los e a perda pode ocorrer devido a manipulação e estocagem das mesmas.

Os resultados das análises com os antimicrobianos mostraram uma alta incidência de cepas resistentes aos agentes testados. É possível notar que nenhum agente apresenta eficácia em 100% das amostras no presente teste, pois apesar de a enrofloxacina e o sulfametoxazol + trimetoprim não apresentarem nenhuma cepa resistente, em algumas amostras sua ação foi intermediária. A incidência de uma grande quantidade de cepas apresentando multiresistência encontradas nesse e em outros trabalhos pode estar associada ao grande uso desses antimicrobianos na produção intensiva de aves, tanto para profilaxia quando para a terapêutica (DEL CERRO et al., 2003). A alta resistência a tetraciclina (73,17% das amostras) pode estar associada ao uso indiscriminado desse antimicrobiano, pois mesmo após a proibição do seu uso nas rações animais, esse antimicrobiano de amplo espectro continua sendo extensivamente utilizado na avicultura (ITO et al., 2005). Os dados encontrados neste trabalho para a tetraciclina concordam com Ribeiro et al. (2006) e Valdezate et al. (2000) que constataram resistência a este antimicrobiano em 100% e 86% respectivamente, nas amostras de *S*. Hadar isoladas de carcaças de frango. Também foi verificada uma grande quantidade de cepas resistentes a estreptomicina (31,7%), dados que também concordam com Ribeiro et al. (2006) que encontrou 100% de resistência para este antimicrobiano. Para a ampicilina um total de 29,27% das cepas testadas apresentaram resistência, dados parecidos com os que Valdezate et al. (2000) obtiveram para este agente (36%) na Espanha. Os dados de multiresistência da *S*. Hadar a antimicrobianos observados na literatura e os resultados obtidos neste trabalho, reforçam a necessidade de um controle cada vez mais rígido no uso de antimicrobianos, não só em animais de produção, mas em todas as classes que deles fazem uso. Apesar de tal problemática, poucos estudos foram realizados para a determinação do perfil de resistência antimicrobiana de *S.* Hadar isoladas de carcaças de frango.

A caracterização bioquímica foi realizada neste trabalho utilizando-se dos testes mais descritos em literatura, mas também respeitando o espaço físico, mão de obra e orçamento a disposição. Para as *Salmonella* os testes bioquímicos são divididos em preliminares e complementares, isso quando são realizados como o intuito de identificação das amostras. No presente trabalho o objetivo foi traçar o perfil bioquímico geral destas bactérias, sendo assim, todos os testes foram realizados concomitantemente. Os resultados bioquímicos encontrados estão

de acordo com os resultados esperados para *Salmonella* sp. (ANVISA, 2004). Os resultados para a arginina e para o dulcitol são variáveis no caso de *Salmonella* sp., mas para as *Salmonella* do grupo C, caso da *S.* Hadar (Grupo C2), tendem a ser em sua maioria negativas (MACFADDIN, 2000). No presente trabalho um número considerável de amostras mostrou resultado positivo para os dois testes (Tabela 7), podendo esse dado ser indício de uma adaptação da bactéria ao ambiente em que ela se encontrava. Foram observadas alterações também no meio TSI e LIA, onde para as *Salmonella* sp. esperava-se uma reação alcalina na região de bisel (superior) em todas as amostras. No entanto algumas amostras apresentaram resultado diferente apresentando uma reação ácida. Tal alteração ocorre devido à desaminação da lisina, no caso do ágar LIA, e a fermentação de dois ou três açúcares no caso do ágar TSI . Também houve um resultado negativo para o citrato onde se esperava que todas as amostras fossem positivas (ANVISA, 2004).

Na Tabela 9 buscou-se traçar uma relação entre os genes encontrados pelos PCRs e os resultados dos testes com antimicrobianos e bioquímicos. A partir dos genes pesquisados neste trabalho nenhuma relação linear pode ser feita com os resultados das outras análises, no entanto é sabido que uma das principais formas de disseminação de resistência a antimicrobianos e adaptação a diferentes condições de sobrevivência é a transferência horizontal de material genético (MEL; MEKALANOS, 1996; DEL CERRO et al., 2003; CHEN et al., 2005). Os genes responsáveis por fornecer tal condição às bactérias são específicos, podendo estar inseridos no próprio cromossomo bacteriano, ou em plasmídios (CHEN et al., 2005). Como exemplo, para a tetraciclina que se obteve um alto índice de resistência neste trabalho, Chen et al., (2004), ao analisar amostras também resistentes a esse agente encontraram a presença dos genes *tet*A e/ou *tet*B em todas as amostras testadas. O mesmo ocorre com a estreptomicina, porém neste caso o gene envolvido é o *aad*A. No entanto, existem casos em que o gene relacionado à resistência a certa droga está presente no genoma bacteriano, mas não está sendo expresso e desta forma o microrganismo ainda se apresenta sensível a esta droga (ZHAO et al., 2001). Ainda pode-se acrescentar que a expressão desses genes de resistência está relacionada diretamente a pressão de seleção sobre eles exercida, ou seja, a aquisição do gene acontece por transferência genética entre bactérias ou através de mutações, no entanto outros fatores como a utilização desordenada de drogas antimicrobianas podem contribuir para que ocorra a disseminação de resistência (COURVALIN, 2005).

Ainda há muito que estudar sobre as bactérias e a sua constituição molecular, mas o que está cada vez mais explícito, é que o simples conhecimento do genoma dos microrganismos ou de seus fatores de virulência muito pouco serve se nós não soubermos interpretar qual a contribuição de cada um desses elementos para a sua patogenicidade. Assim, os resultados obtidos neste trabalho dão início a um processo pelo qual se deseja usar o conhecimento gerado através de análises laboratoriais juntamente com testes *in vivo*, para se avaliar a patogenicidade das cepas de *Salmonella* independentemente a qual sorovar ela pertença, pois dentro dos sorovares considerados não patogênicos podem existir cepas tão virulentas quanto às cepas pertencentes aos sorovares de mais alto risco. Os resultados deste trabalho acerca da *S*. Hadar só vêm confirmar esse fato. As análises de PCR mostram que ao contrário do que se pensa, este sorovar possui a capacidade de invadir as células do hospedeiro, pois dispõem do maquinário necessário para isso. Associando esses dados aos resultados da pesquisa de resistência a antimicrobianos encontrados, os quais apontam uma alta porcentagem de cepas de *S*. Hadar apresentando multiresistência, e também aos resultados bioquímicos, que mostram uma possível adaptação desta bactéria ao meio em que ela vive, pode-se afirmar que mesmo pertencendo a um sorovar considerado de baixo risco esse sorovar da *Salmonella* merece a nossa atenção. Desenvolvendo esse tipo de ferramentas conseguimos fazer cada vez mais com que a pesquisa se aproxime do campo, atingindo o que deveria ser o objetivo de todos os pesquisadores da área de produção animal, que é melhorar cada vez mais a inocuidade e a qualidade do produto final.

6. CONCLUSÃO

1. Os protocolos de PCRs propostos no presente trabalho se mostraram viáveis na detecção dos sete genes associados à virulência de *Salmonella* sp., pois todos amplificaram fragmentos de DNA em tamanho de pares de base compatíveis com genes pesquisados.

2. Utilizando-se dos protocolos de PCR padronizados, foi possível a pesquisa dos genes associados à aderência e invasão de células intestinais nas amostras de *Salmonella* Hadar. Após a realização dos testes com antimicrobianos em *Salmonella* Hadar, pode-se observar que 37 cepas apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano e 13 amostras foram resistente a duas ou mais drogas, dados que enfatizam a necessidade de um controle cada vez mais rígido no uso de antimicrobianos. Todas as 41 amostras foram confirmadas bioquimicamente como sendo do gênero *Salmonella*, apresentando variação apenas para arginina, dulcitol, TSI/Bisel, LIA/Bisel e citrato, dentre todos os testes bioquímicos utilizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEKSHUN, M.; LEVY, S. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v. 128, p. 1037-1050, 2007.

ALMEIDA, R. T.; PALERMO-NETO, J. Uso de Antimicrobianos em Avicultura e o Desenvolvimento de Resistência Bacteriana. In: PALERMO-NETO, J., SPINOSA, H. S., GÓRNIAK, S. L. (Ed.). **Farmacologia Aplicada à Avicultura**. 1. Ed. Roca, 2005. P. 161-173.

ANDERSON, D.I. Persistence of antibiotic resistant bacteria. **Curr. Opin. Microbiol**., v. 6, p. 452-456, 2003.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. Disponível em <URL: http:// www.cchi.med.br/mod42004.pdf> Acesso em 23 de outubro de 2009.

ÁVILA, L. A. F. Controle de Salmonela – Um Desafio Para a Industria Avícola Brasileira. VII Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Incubação. Balneário Comburiu. **Anais**, 2007.

BAJAJ, V.; HWANG, C.; LEE, C. A. *hilA* is a novel *ompR/toxR* family member that activates expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes**. Mol. Microbiol.,** v. 18, p. 715–727, 1995.

BAJAJ, V.; LUCAS, R. L.; HWANG, C.; LEE, C. A. Co-ordinate regulation of *Salmonella* Typhimurium invasion genes by environmental and regulatory factors is mediated by control of *hil*A expression. **Mol. Microbilo**., v. 22, p. 703-714, 1996.

BARON, E. J.; FINEGOLD, S. M. 1990. **Diagnostic Microbiology.** 8th ed. St. Louis: The C. V. Mosby Company.

BARROW, P. A.; SIMPSON, J. M.; LOVELL, M. A. Intestinal colonization in the chicken of food-poisoning *Salmonella* serotypes; microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, v. 17, p. 571-588, 1998.

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HEFFRON, F. Contribution of fimbrial operons to attachment to invasion of epithelial cell lines by *Salmonella* Typhimurium. **Infect. Immun**, v. 64, p. 1862-1865, 1996.(a)

BÄUMLER, A. J.; TSOLIS, R. M.; HFFRON. F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 93, p. 279–283, 1996. (b)

BHUNIA, A. K. *Salmonella enterica*. In: (Ed.). **Foodborne Microbiological Pathogens.** 1.ed. West Laffayetel: Springer, 2008, p. 201-216.

BORGES, F. F. **Dissertação de Mestrado.** Perfil Bioquímico de Amostras de Escherichia coli isoladas de material avícola no Estado do Rio Grande do Sul e sua relação com a Patogenicidade. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2008.

BORSOI, A.; SANTIN, E.; SANTOS, L.R.; SALLE, C.T.P; MORAES, H.L.S; NASCIMENTO, V.P. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. **Poultry Science**, v.88, p.750-758, 2009.

BOWE, F.; LIPPS, C. J.; TSOLIS, R. M.; GROISMAN, E.; HEFFRON, F.; KUSTERS, J. G. At least four percent of the *Salmonella* Typhimurium genome is required for fatal infection of mice. **Infet. Immun**., v. 66, p. 3372-3377, 1998.

BRASIL, 2003. Portaria nº 182 de 17 de setembro de 2003. Ministério da Agricultura, Abastecimento e Reforma Agrária. Análise Microbiológica de Alimentos. Diário Oficial da União. 2003.

BRUMELL, J. H.; STEELE-MORTIMER, O.; FINLAY, B. B. Force Feeding by *Salmonella*. **Curr. Biol**., v. 9, p. 277-280, 1999. BUTLER, T. Typhoid fever. In: GOLDMAN, L., BENNETT, J.C. **Cecil textbook of medicine.** 21. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000. p.1681-1683.

BUTLER, T. Typhoid fever. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J.C. **Cecil textbook of medicine.** 21. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000. p.1681-1683.

BYWATER, R. J. Identification and surveillance of antimicrobial resistance dissemination in animal production. **Poultry Science**, v. 70, p. 2030-2035, 2005.

CAPRA, F. **As Conexões Ocultas**. Ciência para uma vida sustentável. 2 ed. São Paulo: Cultrix, 2002, p. 173.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G.M.; et al. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, n. 1, jan/jun. 2000.

CASTILLA, K.S.; Ferreira, C.S.A.; Moreno, A.M.; Nunes, I.A.; Ferreira, A.J.F. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* e *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, p. 135-139, 2006.

CHEN, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G.; SCHROEDER, C. M.; LU, R.; YANG, H.; et al. Characterization of multiple antimicrobial resistance Salmonella serovars isolated from retail meats. **Appl. Envirom. Microbiol.,** v. 70, p. 1-7, 2004.

CHEN, S.; ZHAO, S.; McDERMOTT, P. F.; SCHROEDER, C. M.; WHITE, D. G.; MENG, J. A DNA microarray for identification of virulence and antimicrobial resistance genes in *Salmonella* serovars and *Escherichia coli.* **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, p. 195-201, 2005.

CHIEW, Y.F.; YEO, S. F.; HALF, L.M.; LIVERMORE, D. M. Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae.* **J. Antimicrob. Chemother**., v. 41, p. 247-251, 1998.

CLARK, M. A.; HIRST, B. H.; JEPSON, M. A. Inoculum composition and *Salmonella* pathogenicity island 1 regulate M- cell invasion and epithelial destruction by *Salmonella* Typhimurium. **Infection and Immunity,** v. 66, n. 2, p. 724-731, 1998.

CLOUTHIER, S. C.; MÜLLER, K. H.; DORAN, J. L., et al. Characterization of three fimbrial genes, *sef*ABC, of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n.9, p. 2523-2533, 1993.

COLLAZO, C. M.; GALAN, J. E. The invasion-associated type III protein secretion system in *Salmonella* – a review. **Gene**, v. 192, p. 51-59, 1997.

CORNELIS, G. R. The type III secretion injectisome. **Nat. Rev**., v. 4, p. 811–825, 2006.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonelosis in Rio Grande do Sul, Brasil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p. 342-346, dec. 2002.

COURVALIN, P. Antimicrobial Drug Resistance: "Prediction Is Very Difficult, Especially About the Futere". **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1503-1506, 2005.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interation of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Clin. Microbiol. Rev.,** v. 12, p. 405-428, 1999.

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

DESMIDT, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella* Hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**, v.60, n.2, p.259-269, 1998.

DORAN, J.L.; COLLINSON, K.; BURIAN, J.; SARLOS, G. TODD, E.C.D; MUNRO, C.K.; KAY, C.M.; BANSER, P.A.; PETERKIN, P.I.; KAY, W.W.. DNA-based diagnostic test for *Salmonella* species targeting *agf*A, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. Journal of **Clinical Microbiology**, v.31, n.9, p.2263-2273, Sep. 1993.

EUROSURVEILLANCE e- Alert. Over 2000 cases so far in *Salmonella* Hadar outbreak in Spain associated with consuption of pre-coocked chicken. 2005. Disponível em <URL: http:// www.salmonellablog.com/Archives/002275.html>Acesso: dezembro 2009.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Microreview: *Salmonella* as an intracellular parasite. **Mol. Microbil**., v.3, p.1833-1841, 1989.

FINLAY, B. B.; RUSCHKOWSKI, S.; DEDHAR, S. Cytoskeletal rearrangements accompanying *Salmonella* entry into epithelial cells. **J. Cell Sci**., v.99, p.83-296, 1991.

GALAN, J. E.; CURTISS, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *S. typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.86, p.6383–6387, 1989.

GALAN, J. E.; CURTISS, R. Distribution of the *inv*A, *inv*B, *inv*C, and *inv*D Genes of *Salmonella* Typhimurium Among Other Salmonella-Serovars - Inva Mutants of *Salmonella* Typhi Are Deficient for Entry Into Mammalian-Cells. **Infection and Immunity**, v.59, n.9, p.2901-2908, 1991.

GALAN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene invA: Homology of InvA to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.13, p.4338-4349, 1992.

GALAN, J. E. Interaction of *Salmonella* with host cells through the centisome 63 type III secretion system. **Curr. Opin. Microbiol**., v.2, p.46-50, 1999.

GALAN, J. E.; ZHOU, D. Striking a balance: modulation of the actin cytoskeleton by *Salmonella*. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.97, p.8754–8761, 2000.

GALAN, J. *Salmonella* Interactions With Host Cells: type III Secretion at Work. **Ann.Rev. Cell Develop. Biol.,** v.17, p.53-86, 2001.

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

GAST, R. K. *Salmonella* Infections. In: SAIF, Y.M. (Ed.). **Disease of Poultry**. 12.ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2008, p.619-674.

GIBSON, D. L; et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology Sgm**, v.153, p.1131-1140, 2007.

GOMES, M. J. P. **Enterobacteráceas (*Salmonella* sp.)**. Bacteriologia da Favet –UFRGS – Microbiologia Clínica. Disponível em <URL http:// www.ufrgs.com/labacvet>. Acesso em 20 de novembro de 2009.

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

GROISMAN, E.A.; OCHMAN, H. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. **Cell**, v.87, p.791-794, 1996.

GROISMAN, E. A.; OCHMAN, H. How *Salmonella* became a pathogen. **Trend. Microbiolo**., v.5, p.343-349, 1997.

GUERRA, B.; JUNKER, E.; SCHOETER, A.; HELMUTH, R.; GUTH, B. E.; BEUTIN, L. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. **J. Antimicrob. Chemother**., v.52, p.489-492, 2003.

GUERRANT, R. L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T. S.; et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.,** v.32, p.331-350, 2001.

GULIG, P. A.; DANBARA, H.; GUINEY, D. G.; LAX, A. J.; NOREL, F.; RHEM, M. Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. **Mol. Microbiol**., v.7, p.823-830, 1993.

GUO, X.; CHEN, J.; BEUCHAT, L. R.; BRACKETT, R. E. PCR Detection of *Salmonella enterica* Serotype Montevideo in and on Raw Tomatoes Using Primers Derived from *hilA.* **Applied and Environmental Microbiology,** v.66, n.12, p.5248-5252, 2000.

GYLES, C. L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. **Animal Health Research Reviews**, v.9, n.2, p.149-158, 2008.

HARDT, W. D.; GALAN, J. E. A secreted *Salmonella* Protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.94, p.9887-9892, 1997.

HENEGARIU, O.; HEEREMA, N. A.; DLOHY, S. R.; VANCE, G. H.; VOGT, P. H. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by protocol. **Biotechniques**, v.23, n.3, p.504-511, 1997.

HEUZENROEDER, M. W.; MURRAY, C. J.; DALCIN, R. M. Molecular basis of benign colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. **Rural Industries Research and Development Corporation**, n.1/106, 2001.

HIRSH, D.C. Salmonella. In: **Microbiologia Veterinária**. Ed. Guanabara Koogan S.A. p.70-73, 2003.

HOLT, J. G. **Bergey's: manual of determinative bacteriology**. 9.ed. Baltimore: Williams & Williams, 1994, p.186-7.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Rev.Microbiol.**,v.2, p.504-509, 2004.

IMRE, A.; OLASZ, F.; KISS, J.; NAGY, B. A novel transposon-based method for elimination of large bacterial plasmids. **Plasmid**., v.55, p.235-241, 2006.

ITO, N. M. K.; et al. Antimicrobianos: usos preventivos e curativos na avicultura. In: PALERMO-NETO, J., SPINOSA, H. S., GÓRNIAK, S.L. **Farmacologia aplicada à avicultura.** 1.ed, São Paulo: Roca, 2005, p.115-147.

ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. C.; OKABAYASHI, S. M. Saúde Intestinal em Frangos de Corte. 2007. Circular Técnica Aviagem do Brasil. Disponível em: URL <http //www.agroceresrosss.com.br/ imagem/notícias/384CircularTecnicaAviagem-200711.pdf> Acesso em 27 de janeiro de 2010.

KAYE, D. *Salmonella* infections other than typhoid fever. In: GOLDMAN, L., BENNETT, J.C. **Cecil textbook of medicine.** 21. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000. p.1683-1685.

KEERSMAECKER, S. C. J.; MARCHAL, K.; VERHOEVEN, T. L. A.; ENGELEN, K.; VANDERLEYDEN, J.; DETWEILER, C.S. Microarray analysis and motif detection reveal new targets of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium HilA regulatory protein, including HilA itself. **Journal of Bacteriology**, v.187, n.13, p.4381-4391, 2005.

KELLER, E. F. **The century of the gene**. Harvard University Press, Cambridge, Mass, 2000.

KONEMAN, E.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** 5 ed. Philadelphia: ippincott, 1997, p.500-530.

LAKE, R.; HUDSON, A.; CRESSEY, P. **Risk profile: Salmonella (non typhoid) in poultry (whole and pieces)** October 2002. INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND RESEARCH LIMITED. Disponível em: <URL http:// www.esr.cri.nz> Acesso em: 08 nov. 2009.

LAPIERRE, L.; CORNEJO, J.; BORIE, C.; TORO, C.; MARTÍN, B. S. Genetic characterization of Antibiotic Resistance Genes Linked to Class 1 and Class 2 Integrons in Commensal Strains of *Escherichia col*i isolated from Poultry and Swine. **Microbial Drug Resistence**, v.14, n.4, 2008.

LIBBY, S.J.; HALSEY, T.A.; ALTIER, C., et al. *Salmonella*. In: **Pathogenesis of Bacterial Infectious in Animals**. 3° ed. Blackwell Publishing, 2004, USA.

LUCAS, R. L.,; LEE, C. A. Unraveling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella* typhimurium. **Mol. Microbiol**., v.36, p.1024–1033, 2000.

MACFADDIN, J. F. 2000. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3th ed. Philadelphia: Lippincott Willians & Wilkins.

MAHON, C.R.; MANUSELIS, G. **Textbook of diagnostic microbiology.** 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000, p.463-514.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.16, n.1, p.47-51, 2002.

MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, C. G.; FINLAY, B.B. *Review - Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v.2, p.145-256, 2000.

MATIASOVICOVA, J.; ADAMS, P.; BARROW, P. A.; HRADECKA, H.; MALCOVA, M.; KARPISKOVA, R.; BUDINSKA, E.; PILOUSOVA, L.; RYCHLIK, I. Identification of putative ancestors of the multidrug resistant *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium DT104 clone harboring the genomic island 1. **Arch. Microbiol**., v.187, p.415-424, 2007.

MATSUI, H.; BACOT, C. M.; GARLINGTON, W. A.; DOYLE, T. J.; ROBERTS, S.; GULIG, P. A. Virulence plasmid-borne *spv*B and *spv*C genes can replace the 90-kilobase plasmid in conferring virulence to *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium in subcutaneously inoculated mice. **J. Bacteriol**., v.183, p.4652-4658, 2001.

MEL, S.F.; MEKALANOS, J. J. Modulation of Horizontal Gene Transfer in Pathogenic Bacteria by in Vivo Signals. **Cell**, v.87, p.795-798, 1996.

MILLS, D. M.; BAJAJ, V.; LEE, C. A. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. **Mol. Microbiol**., v.15, p.749–759, 1995.

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

MIROLD, S.; RABSCH, W.; TSCHAPE, H.; HARDT, W. D. Transfer of the *Salmonella* type III effector *sop*E between unrelated phage families. **J. Mol. Biol**., v.312, p. 7-16, 2001.

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

NASCIMENTO, V. P.; et al. Qualidade microbiológica dos produtos avícolas. In: II SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA DA ASSOCIAÇÃO GOIANA DE AVICULTURA E ESCOLA DE VETERINÁRIA DE UFG. **Anais**. 1996. p.13-17.

NÓGRÁDY, N.; IMRE, A.; RYCHLIK, I.; BARROW, P. A.; NAGY, B. Growth and colonization suppression of *Salmonella enteric* serovars Hadar in vitro and in vivo. **FEMS Microbiology Letters**, v.218, p.127-133, 2003.

NORRIS, T. L.; BÄUMLER, A. J. Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.96, p.13393–13398, 1999.

OLIVEIRA, G. H.; BERCHIERI Jr, A.; BARROW, P. A. Prevention of Salmonella infection contact using intestinal flora of adult birds and/or a mixture of organic acids. **Braz. J. Microbiol**., v.33, p.116-120, 2000.

OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M. I. R.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, p.123-124, 2003.

PARANCHYCH, W.; FROST, L. S. The physiology and biochemistry of pili. **Adv. Microb**., v.29, p.53-114, 1988.

PAYMENT, P.; RILEY, M. S. **Resolving the Global Burden of Gastrointestinal Illness: A Call to Action**. American Academy of Microbiology. Washington, DC, 2002. Disponivel em: http://www.asmusa.org. Acesso em: 12 nov. 2009.

PRAGER, R.; RABSCH, W.; STRECKEL, W.; VOIGT, W.; TIETZE, E.; TSCHÄPE, H. Molecular properties of *Salmonella* enteric Serotype Paratyphi B Distinguish between Its Systemic and Its Enteric Pathovars. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41 n.9, p.4270-4278, 2003.

POOPE, C. Salmonelosis in poultry and people. **Supplement of World Poultry – Misset**, p.13-14, 1996.

PORTER, S. B.; CURTISS, R. Effect of inv Mutations on *Salmonella* Virulence and colonization in – Day – Old White Leghorn Chicks. **Avian Diseases**, v.41, p.45 – 57, 1997.

RAHN,K.; et al. Amplification of an *inv*A gene sequence of *Salmonella* typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v.6, n.4, p.271-279, 1992.

RIBEIRO, A. R.; et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.3, p.357-360, 2006.

ROCHA, A. C. G. P. **Tese de Doutorado.** Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) para a Classificação de Patogenicidade de Amostras de Escherichia coli Isoladas de Frangos de Corte. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2006.

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

RODRIGUES, D. P.; FONSCECA, E. L. Resistência antimicrobiana. **Manual de procedimentos para determinação da susceptibilidade antimicrobiana em enterobactérias.** Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ – Laboratório de Referência Nacional de Cólera e Outras Enteroinfecções bacterianas LRNCEB/LABENT, 2006.

ROSE, N.; BEAUDEAU, F.; DROUIN, P.; TOUX, J. Y.; ROSE, V.; COLIN, P. Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and desinfection in French broiler-chicken houses. **Preventive Veterinary Medicine**, v.44, p.9 – 20, 2000.

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

ROWE, B.; HALL,M. L.; WARD, L.R.; SA, J. D. Epidemic spread of *Salmonella* Hadar in England and Wales. **Br. Med. J.**, v.280, p.1065-1066, 1980.

ROWE-MAGNUS, D. A.; MAZEL, D. Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. **Curr. Opin. Microbiol**., v.4, p.565-569, 2001.

SALLE, S. O. **Tese de Doutorado.** Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação da resistência a antimicrobianos e do comportamento bioquímico de amostras de Escherichia coli isoladas de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2009.

SANTOS, D. M. S.; BERCHIERI, A. J.; FERNANDES, S. A.; et al. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 39-42, 2000.

SANTOS, L. R. **Tese de Doutorado**: Fagotipagem e análise por RAPD/PCR (DNA polimórfico amplificado ao acaso) de amostras de *Salmonella* Enteritidis isolada de materiais de origem avícola e de alimentos e humanos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2001.

SATO, Y.; SATO, G.; TUCHILI, L.; PANDEY, G.S.; NAKAGIMA, A.; CHIMANA, H.; SINSUNGWE, H. Status of *Salmonella gallinarum-pullorum* infections in poultry in Zambia. **Avian Diseases**, v.41, p.490 – 495, 1997.

SCHIMDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.17, n.1, p.14-56, 2004.

SEELEY, JR, H. W.; VANDERMARK, P. J.; LEE, J. J. 1991. **Microbes in action. A Laboratory Manual of Microbiology**. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company.

SHELOBOLINA, E. S.; SULLIVAN, S. A.; O'NEILL, K. R.; NEVIN, K. P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U (VI)-contamined subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.,** v.70, p. 2959-2965, 2004.

SILVA, J. M. L. Salmonelose na indústria avícola brasileira – A ameaça do Tifo Aviário. In: **Produção e qualidade de pintos de um dia**, 1981, Brasília, Anais. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, p.319-330, 1981.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciência Avic.,** v.4, p.85-100, 2002.

SOUZA, G. F. **Dissertação de Mestrado.** Estabelecimento de uma nova metodologia para o cálculo de patogenicidade em amostras de Escherichia coli provenientes da produção de frango de corte. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Veterinária, PPGCV, 2006.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2000, p.83.

TURNBULL, P. C. B. Food poisoning with special reference to Salmonella- its epidemiology, pathogenesis and control. Clinical Gastroenterol., v.8, p.663-713, 1979.

VALDEZATE, S.; ECHEITA, A.; DÍEZ, R.; USERA, M. A. Evaluation of Phenotypic and Genotypic Markers for Characterization of the Emerging Gastroenteritis Pathogen *Salmonella* Hadar. **Clin Microbiol Infect Dis**., v.19, p.275–281, 2000.

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

VAN IMMERSEEL, F.; EECKHAUT, V.; BOYEN, F.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. Mutations influencing expression of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island I key regulator *hilA*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.94, p.455-461, 2008.

VIDAL, J. E.; DA SILVA P. R.; SCHIAVON NOGUEIRA, R.; BONASSER FILHO, F.;HERNANDEZ, A.V. Liver abscess due to *Salmonella* Enteritidis in a returned traveler with HIV infection: case report and review of the literature. **Rev. Inst. Med.Trop. Sao Paulo,** v.45, p.115-117, 2003.

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

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

WEIDE-BOTJES, M. ; et al. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar: evaluation and application of different typing methods. **Veterinary Microbiology**, v.61, p. 215-227, 1998.

WHANG, Y. P.; LIA, L.; SHENA, J. Z.; YANGB, F. J.; WU, Y. W. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. **Veterinary Microbiology**, v.133, p.328-334, 2009.

WHITE, P. A.; McIVER, C. J.; RAWLINSON, W. D. Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.9, p.2658-2661, 2001.

WIGLEY, P.; HULME, S. D.; POWERS, C.; BEAL, R.K.; BERCHIERI JR, A.; SMITH, A.; BARROW, P. Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar Pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. **Infect. Immun.**, v.73, p.2986-2990, 2005.

WOODWARD, M. J.; MCLAREN, I.; WRAY, C. Distribution of virulence plasmids within *Salmonellae*. **J. Gen. Microbiol**., v.135, p.503-511, 1989.

ZHANG, S.; et al. The *Salmonella enterica* setorype Typhimurium effectors proteins SipA, SopB, SopD and SopE2 act in concert to induce diarrhea in calves. **Infection and Immunity**, v.70, n.7, p.3843-3855, 2002.

ZHAO, S.; WHITE, D. G.; GE, B.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; ENGLISH, L.; et al. Identification and characterization of integrons mediated antibiotic resistance among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates. **Appl. Environ. Microbiol**., v. 67, p.1558-1564, 2001.

ANEXO A – Quadro com a fonte e o ano de isolamento das *Salmonella* Hadar utilizadas no trabalho.

Amostra	**Fonte**	**Sorovar**	**Ano de Isolamento**
1	Coxa	*Salmonella* Hadar	1995
2	Coxa	*Salmonella* Hadar	1995
5	Peito	*Salmonella* Hadar	1995
8	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
10	Peito	*Salmonella* Hadar	1995
12	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
15	Asa	*Salmonella* Hadar	1995
16	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
17	Asa	*Salmonella* Hadar	1995
20	Coxa	*Salmonella* Hadar	1995
33	Peito	*Salmonella* Hadar	1995
40	Asa	*Salmonella* Hadar	1995
42	Asa	*Salmonella* Hadar	1995
45	Coxa	*Salmonella* Hadar	1995
323	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
338	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
340	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
356	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
368	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
792	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
799	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
803	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
807	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
825	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
829	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
884	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
889	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1995
906	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
908	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
909	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
910	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
913	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
914	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996
928	Carcaça	*Salmonella* Hadar	1996

M4	Mecônio	*Salmonella* Hadar	?
1390	Suabe de Cama	*Salmonella* Hadar	?
1195	Suabe de Cama	*Salmonella* Hadar	?
4756	Suabe de Cama	*Salmonella* Hadar	?
825	Suabe de Cama	*Salmonella* Hadar	?
4849	Suabe de Cama	*Salmonella* Hadar	?
2483	Suabe de Cama	*Salmonella* Hadar	?

ANEXO B – Tabela com os antimicrobianos utilizados e seus respectivos halos de acordo com a NCCLS 2005.

Tabela - Antimicrobianos usados e seus respectivos halos de resistência, valor intermediário e de sensibilidade.

Antimicrobianos	**R***	**I***	**S***
Florfenicol	≤ 14	15-18	≥ 19
Amoxicilina	≤ 11	12-13	≥ 14
Ampicilina	≤ 13	14-16	≥ 17
Sulfa. + Trime.**	≤ 10	11-15	≥ 16
Neomicina	≤ 12	13-16	≥ 17
Estreptomicina	≤ 11	12-14	≥ 15
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Norfloxacina	≤ 12	13-16	≥ 17
Ciprofloxacina	≤ 15	16-20	≥ 21
Enrofloxacina	≤ 16	17-22	≥ 23
Ceftiofur	≤ 17	18-20	≥ 21
Tetraciclina	≤ 14	15-18	≥ 19
Eritromicina	≤ 13	14-22	≥ 23
Lincomicina	≤ 14	15-16	≥ 17

*R=Resistente; I=Intermediário; S=Sensível. **Sulfametoxazol+Trimetropin.

ANEXO C – Artigo publicado na revista Veterinária em Foco v.6, n.2, p. 159-164 - jan./jun. 2009.

PESQUISA DE GENES DE VIRULÊNCIA EM *SALMONELLA* HADAR EM AMOSTRAS PROVENIENTES DE MATERIAL AVÍCOLA

CESCO, M.A.O[1]; ZIMERMANN, F.C[1]; GIOTTO, D.B[1]; GUAYBA, J[1]; BORSOI, A[1]; ROCHA[1], SL; MORAES, H.L.S[1]. NASCIMENTO, V.P[1];

RESUMO

A salmonelose é uma das mais importantes zoonoses, mundialmente reconhecida por sua implicação em saúde pública e também por resultar em perdas econômicas na produção animal. Dentro do gênero *Salmonella*, que é constituído por mais de 2.500 sorovares, o sorovar Hadar tem merecido atenção, pois foi o terceiro mais isolado no mundo em 1995 (HERIKSTAD et al., 2002) e o terceiro mais isolado em humanos entre 1997 e 2001 na Espanha (ECHEITA et al., 2005). Em 2005, também na Espanha, mais de 200 casos de salmonelose em humanos foram provocados pelo sorovar Hadar, transmitido pelo consumo de carne de frango (EUROSURVEILLANCE, 2005). No Brasil, mais especificamente no Rio Grande do Sul, Nascimento et al. (1996) relataram a prevalência de *Salmonella* em carcaças e partes de frango, sendo a *Salmonella* Hadar a segunda mais isolada (26%). O resultado das infecções por *Salmonella* é determinado pelo *status* do hospedeiro e o *status* da bactéria. Enquanto idade, genética e fatores ambientais podem determinar o *status* do hospedeiro, o status das bactérias é determinado pelos chamados fatores de virulência. No presente trabalho foram pesquisados três genes de virulência relacionados à *Salmonella*, os genes fimbriais *inv*A, *agf*A e *lpf*A. Foram testadas 45 amostras isoladas a partir de mecônio, carcaças e cortes de frango no Rio Grande do Sul, pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os testes foram feitos através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e as leituras foram feitas em gel de agarose a 1,2% corados com brometo

de etídio e visualizados sob luz ultravioleta. Os resultados obtidos mostram a presença dos três genes em todas as amostras de *Salmonella* Hadar testadas.

ABSTRACT:

Salmonelosis is one of the most important zoonosis, recognized in all of the world for its importance in public health,resulting in economic lost in animal production. Inside Salmonella genus, wich has more than 2500 serovars, the sorovar Hadar have been deserving special attention, because it was the third most isolated inthe world in 1995 (HERISKTAD et al., 2002) and the third most isolated in humans between the years of 1997 and 2002 in Spain (ECHEITA et al., 2005). Also, in Spain, in the year of 2005 more than 200 cases of salmonelosis in humans were caused by the Hadar sorovar, transmitted through poultry meet consumption (EUROSURVEILLANCE, 2005). In Brazil, more specifically in Rio Grande do Sul, Nascimento et al., (1996) told the prevalence of Salmonella in poultry and poultry parts, b the S. Hadar the second most isolated (26%). The results of Salmonella infection is determined by the host status and the status of bacteria. While age, genetic and environmental factors can determine the status of the host, the status of bacteria is determined by the called virulence factors. In this work tree genes were analyzed, the genus invA, agfA and lpfA. 45 samples were tested , isolated from carcass, parts of carcass and feces samples in Rio Grande do Sul, by the Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) from Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). The tests were made by the Polimerase Chain Reaction (PCR) and the reads were made in 1,2% agarose gel colored with etidium bromet and analyzed in UV light. Results show the presence of all three genes in all samples of Salmonella Hadar tested.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos que compõem um dos grupos mais complexos das *Enterobacteriaceae*, com mais de 2.500 sorotipos descritos. Essas bactérias estão amplamente dispersas na natureza e podem ser encontradas no trato gastrointestinal de mamíferos, répteis, aves e insetos (KONEMAN, 1997). É também uma das bactérias mais

extensivamente estudadas em termos de fisiologia, genética e estrutura celular, sendo uma das bactérias patogênicas melhor caracterizadas em termos de virulência (DARWIN & MILLER), 1999).

A virulência das salmonelas é multifatorial e complexa, incluindo presença de fímbrias, de flagelos, mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de entero, cito e endotoxinas (RODRIGUES, 2005). Alguns desses fatores são chamados de "clássicos" (VAN ASTEN & DIJK, 2005) e podem estar localizados em elementos genéticos transmissíveis, como *transposons*, plasmídeos ou bacteriófagos, assim como fazer parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, as chamadas Ilhas de Patogenicidade (IP), locais que agrupam a maioria dos genes de virulência (VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005).

As IPs constituem-se por um grupo de genes envolvidos em codificar fatores específicos de virulência. Até o presente momento, cinco IPs foram descritas em *Salmonella* (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001). A IP-1 encontra-se presente em *Salmonella bongori* e todas as variedades de *Salmonella enterica*. Os *operons Inv* (*invasibility*) e *Hil* (*hiper invasibility*) estão presentes nesta ilha, em meio a outros genes e proteínas. O gene *inv*A é o primeiro no *operon*, onde os genes *inv*A, B e C estão arranjados na mesma unidade transcricional e o gene *inv*D está localizado em uma unidade transcricional diferente (GALAN et al., 1992). Estudos demonstraram que a *Salmonella* Typhimurium tem como célula alvo, para entrada no epitélio intestinal de camundongos, a célula M, e que é necessária a presença do gene *inv*A para uma eficiente invasão dessas células (CLARK et al., 1998). As células M da mucosa intestinal são ligadas aos folículos linfóides, que fazem a mediação da resposta inflamatória, recrutamento de granulócitos, macrófagos, monócitos e linfócitos (CALDWELL et al. 2004).

Outro importante influenciador da invasibilidade das *Salmonella* são os sistemas de secreção tipo III (SSTT) (WALLIS & GALYOV, 2000). O SSTT -1, é codificado por alguns genes, inclusive o *inv*A, localizado na IP-1 e estes sistemas são responsáveis pela secreção de proteínas bacterianas que promovem a entrada da bactéria para o interior das células alvo.

Assim como outras bactérias patogênicas, as *Salmonellas* produzem apêndices de membrana chamados de fímbrias, mais curtos que os flagelos. São compostas por apenas uma proteína estrutural, a pilina,e são dispostas de maneira helicoidal na superfície das bactérias gram-negativas (TORTORA, et al. 2000). As fímbrias têm um papel fundamental na adesão às

superfícies sendo importantes na interação bactéria-hospedeiro, persistência ambiental, formação de biofilmes, colonização e invasão de células (GIBSON et al., 2007).

Em salmonelas já foram identificados 20 *operons* fimbriais. Fazendo parte dos *operons* fimbrias *Salmonella*-específicos, está o *agf* (*aggregative fimbriae*), que codifica a fímbria SEF17 ou Tafi (*thin aggregative fimbriae*), a qual permite estabilidadade à salmonela e autoagregação bacteriana. Tafi foi identificada em *S.* Enteritidis por White et al. (2003) que denominaram seu operon de *agf* em 1991. Este gene está envolvido com o aumento da aderência e invasão às células eucarióticas (revisão de GIBSON et al. 2007).

Na prevalência dos *operons* fimbriais *Salmonella* - específicos, está incluído o *lpf* (*long polar fimbriae*), que regula a expressão de fímbria polar. Esta fímbria é mais longa do que as outras fímbrias elaboradas e polarmente localizada na célula bacteriana. O gene *lpf*A codifica a maior subunidade da fímbria, sendo que os genes fimbriais *lpf* completos parecem estar presentes somente em algumas sorovares de *Salmonella* subespécie *entéricas* e *S. bongori*. Provavelmente a fímbria polar esteja envolvida no tropismo pelas placas de Peyer's em intestinos de ratos (BAÜMLER et al., 1998).

Apesar de estarem envolvidas na colonização das células alvo, as fímbrias não têm seu papel completamente compreendido na patogenicidade da *Salmonella* (VAN ASTEN & DIJK, 2005).

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar a presença dos genes de virulência, *inv*A, *agf*A e *lpf*A, em 45 amostras de *Salmonella* Hadar, isoladas a partir de materiais de origem avícola, pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária – CDPA/UFRGS.

MATERIAL E MÉTODO

O trabalho em questão foi realizado no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre. Foram analisadas 45 amostras de *Salmonella* Hadar, isoladas a partir de mecônio, carcaças e cortes de frango no Rio Grande do Sul, previamente identificadas no Instituto Oswaldo Cruz e que estavam estocadas na bacterioteca do CDPA-UFRGS. As amostras estavam acondicionadas em Agar Estoque e após reativação em caldo BHI, foram passadas para o caldo Rappaport-Vassiliadis que foi colocado em banho-maria a 42ºC por 24h. Após, as amostras foram estriadas

em Agar Verde Brilhante (BGN) e incubadas novamente a 37ºC por 24h, para isolamento das colônias. Então foram selecionadas de 3 a 5 colônias com características compatíveis com as de *Salmonella* e inoculadas em microtubos tipo *eppendorf* contendo 1 ml de caldo BHI, sendo estes então incubados por 24h a 37ºC. A extração do DNA foi realizada a partir desta alíquota de BHI contida nos *eppendorfs*, e seguiu a técnica adaptada de Xuan Guo (2000), a qual é realizada a partir de centrifugações das alíquotas, seguidas de lavagem das mesmas e obtenção do DNA por lise das células bacterianas em banho–maria a 100ºC. Os *mixes* utilizados nas três reações eram semelhantes e continham um volume total de 25 µL, compostos de 2,5 µL de solução tampão (10 X), 2 µL de dinucleotídios (2,5 mM), 1 µL de cada primer (20pmol), 0,2 µL de Taq polimerase (1 U), 1,25 µL $MgCl_2$ (2,5 mM), (para o gene *lpf*A a quantidade de $MgCl_2$ foi de 2 µL) e 2 µL do DNA previamente extraído.

Os protocolos para o termociclador também eram muito parecidos, neles as amostras eram submetidas à desnaturação inicial de 5 minutos a 94 ^{0}C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 ^{0}C por 1 segundo, anelamento à 55^{0}C (para o gene *agf*A a temperatura de anelamento foi de 58^{0}C) por 1 segundo e extensão à 74^{0}C por 21 segundos realizando-se uma extensão final à 72^{0}C por 7 minutos. Os *primers* para cada gene utilizado nas reações estão descritos na tabela abaixo.

Tabela 1: *Primers* para os genes *inv*A, *agf*A e *lpf*A.

Gene		*Primers*
***inv*A**	**F**	**5' GTG AAA TTA TCG CCA CGT TCG GGC AA 3'**
	R	**5' TCA TCG CAC CGT CAA AGG AAC C 3'**
***agf*A**	**F**	**5'TCC ACA ATG GGG CGG CGG CG 3'**
	R	**5'CCT GAC GCA CCA TTA CGC TG 3'**
***lpf*A**	**F**	**5'CTT TCG CTG CTG AAT CTG GT 3'**
	R	**5'CAG TGT TAA CAG AAA CCA GT 3'**

Após a amplificação as amostras foram aplicadas em gel de agarose (1,2 %) com 20 % de brometo de etídeo, juntamente com um marcador de peso molecular. O gel foi submetido a eletroforese e posterior leitura em luz ultra violeta.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos testes mostram a presença dos três genes investigados em todas as amostras de *Salmonella* Hadar testadas, como pode ser verificado nas Figuras 1 a 3.

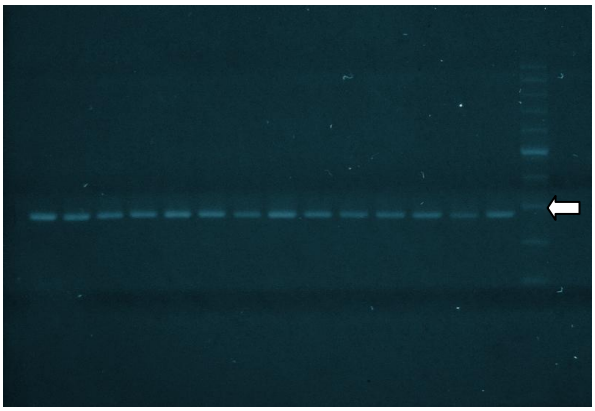

Figura 1: Imagem do gel de agarose. Bandas compatíveis com gene *inv*A dos isolados de *S.* Hadar (284 pares de bases). Seta indicando banda de 300pb do marcador de peso molecular.

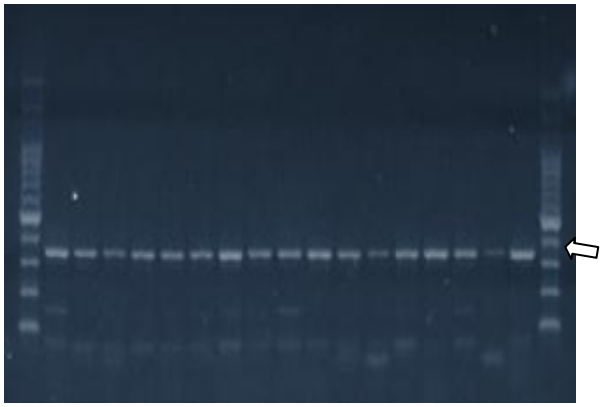

Figura 2: Imagem do gel de agarose. Bandas compatíveis com gene *agf*A dos isolados de S. Hadar (350 pares de bases). Seta indicando banda de 400pb do marccador de peso molecular.

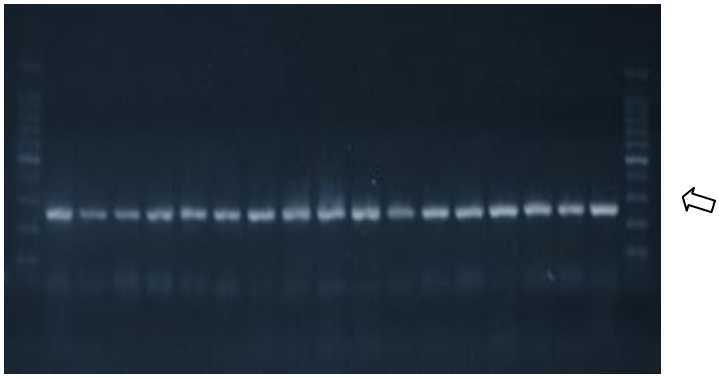

Figura 3: Imagem do gel de agarose. Bandas compatíveis com gene *lpf*A dos isolados de *S*. Hadar (250 pares de bases). Seta indicando banda de 300pb do marcador de peso molecular.

A *Salmonella* Hadar pertence ao grupo das salmonelas partíficas ou zoonóticas, porém, diferente destas, S. Hadar, não é considerada, até o momento, pelo *European Union Zoonosis Council Directive* 92/117/EEC, um sorovar invasivo. No entanto, este sorovar já foi isolado de órgãos de aves (DESMIT et al., 1998) e, associando este fato aos resultados desse trabalho, pode-se sugerir que a mesma possui um potencial invasivo. É neste contexto que estudos do genótipo da *S.* Hadar, como o realizado neste trabalho, vêem a contribuir para a sua caracterização e maior entendimento da interação da mesma com o hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CLARK,M.A.; HIRST,B.H.; JEPSON,M.A. Inoculum composition and Salmonella pathogenicity island 1 regulate M- cell invasion and epithelial destruction by Salmonella typhimurium. **Infection and Immunity**, v.66, n.2, p.724-731, 1998.

DESMIDT,M.; DUCATELLE,R.; HAESEBROUCK,F. Serological and bacteriological observations on experimental infection with Salmonella hadar in chickens. **Veterinary Microbiology**, v.60, n.2-4, p.259-269, 1998.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interation of *Salmonella* withthe Intestinal Mucosa. **Clin. Microbiol. Rev.,** 12: 405-428, 1999.

ECHEITA, M. A.; HERRERA, S.; GARANIZAR, J. et al. Multiplex- PCR based detection and identification of most common *Samonella* second-phase flagellar antigens. **Research in Microbiology**, v.153, p.107-113, 2002.

EUROSURVEILLANCE e- Alert. Over 2000 cases so far in *Samonella* Hadar outbreak in Spain associated with consuption of pre-coocked chicken. Disponível em <URL: http:// www.*Samonella*blog.com/Archives/002275.html >Acesso: mar. 2006.

GALAN,J.E.; GINOCCHIO,C.; COSTEAS,P. Molecular and functional characterization of the Salmonella invasion gene invA: Homology of InvA to members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, v.174, n.13, p.4338-4349, 1992.

GIBSON,D.L., et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in Salmonella Enteritidis. **Microbiology-Sgm**, v.153, p.1131-1140, 2007.

GUO, X.; CHEN, J.; BEUCHAT, L.R.; et al. PCR detection of *Samonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hil*A. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 5248-5252, 2000.

HERISKTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiol. Infect.**, 129:1-8, 2002.

KONEMAN, E.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** 5 ed. Philadelphia: Lippincott,1997.p. 500-530.

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

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6 ed. Porto Alegre, Artmed, 2000. p.83.

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

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