



**unesp**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



Caracterização molecular e da virulência de cepas de *Salmonella*  
spp. isoladas em uma planta de abate de aves.

**STÉFANI THAIS ALVES DANTAS**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos.

*Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall*

**BOTUCATU – SP  
2018**



Instituto de Biociências de Botucatu.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIEÊNCIAS DE BOTUCATU

Caracterização molecular e da virulência de cepas de *Salmonella*  
spp. isoladas em uma planta de abate de aves.

**STÉFANI THAIS ALVES DANTAS**

**VERA LÚCIA MORES RALL**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biologia de Parasitas e Micro-organismos.

*Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall*

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Dantas, Stéfani Thais Alves.

Caracterização molecular e da virulência de cepas de Salmonella spp. isoladas em uma planta de abate de aves / Stéfani Thais Alves Dantas. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Vera Lúcia Mores Rall

Capes: 21200009

1. Salmonela. 2. Biofilme. 3. Virulência. 4. Agentes anti-infecciosos. 5. Abatedouro de aves.

Palavras-chave: Biofilme; Genes de virulência; Invasão; PFGE.

*Aos meus pais (Pedro e Vânia) e aos meus irmãos (Joicy e Davi), com muito amor e gratidão, por todo amor e cuidado que sempre dedicaram a mim e por dividirem comigo esse sonho. Amo vocês.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Meus sinceros agradecimentos...*

*A Deus por estar sempre ao meu lado, me capacitando, guiando meus passos e colocando pessoas especiais em meu caminho;*

*À minha família que é o alicerce da minha vida, meu maior amor, que sempre estiveram presentes apesar da distância física me apoiando e incentivando;*

*À minha mãe, minha heroína e melhor amiga, por ter me dado o dom da vida, por todo amor e todas as noites em claro velando pelo meu sono, por ser meu exemplo de vida e caráter, espero um dia retribuir todo esse cuidado;*

*À minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Lúcia Mores Rall, pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos com muito entusiasmo, por todos esses anos de convivência e amizade;*

*À professora Terue Sadatsune, por toda atenção e carinho com que me recepciona todos os dias e por compartilhar comigo preciosos conhecimentos;*

*Ao tio Alfredo, tia Ana e Caroline Zavatte, por me acolherem e se tornarem minha família em Botucatu;*

*Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Bruna, Caroline, Érika, Fernanda e Ivana, pela amizade, companheirismo e por tornarem os dias mais leves e alegres;*

*Às minhas amigas, Melissa e Regiane, pelas boas conversas, por toda alegria e conhecimentos compartilhados;*

*Aos amigos Fábio (Kuika), Flávia (Tijuro), Henrique (Jumbo), Natália (Tops), Tayla (Rebola) por toda cumplicidade e por tornarem meus dias em Botucatu especiais e inesquecíveis;*

*Aos amigos Armando Tadeo (Caracas), Elisângela (Dan), Fabi, Heloisa (K-lúnia), Isabella (Lost) e Luciane (Hã?), por estarem presentes no meu dia a dia apesar dos quilômetros que nos distanciam;*

*A todos os demais amigos que de certa forma estiveram presentes me apoiando e ajudando durante todos esses anos;*

*Aos professores, discentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia;*

*À Ana Claudia Acerra, pela alegria que nos contagia diariamente e por toda ajuda na finalização deste trabalho;*

*Aos professores Prof. Dr. Ary Fernandes Júnior, Prof. Dr. Adriano Sakai Okamoto e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra de Moraes Gimenes Bosco por terem participado da banca de qualificação contribuindo para a melhoria deste trabalho;*

*Ao Dr. Carlos Henrique Camargo, pela amizade e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho;*

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida;*

*E a todos que de certa forma contribuíram para a concretização deste trabalho.*

## ***EPÍGRAFE***

*"Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano de verdade continua misterioso diante de meus olhos."*

*Isaac Newton*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	14
<b>ABSTRACT</b> .....	15
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. Características gerais de <i>Salmonella</i> spp.....	16
1.2. Salmonelose .....	18
1.3. Fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade em humanos .....	20
1.4. Resistência a antibacterianos .....	26
1.5. Caracterização molecular por Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	31
3.1. Obtenção das cepas de <i>Salmonella</i> spp.....	31
3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) na pesquisa dos genes envolvidos na virulência de <i>Salmonella</i> spp. ....	32
3.2.1. Extração de lisado bacteriano contendo DNA.....	32
3.2.2. Amplificação do DNA .....	32
3.2.3. Visualização dos produtos amplificados .....	33
3.3. Caracterização molecular por PFGE.....	34
3.4. Teste da capacidade de adesão e invasão das cepas de <i>Salmonella</i> spp. em cultura celular.....	35
3.4.1. Cultivo de células HeLa .....	35
3.4.2. Teste adesão das cepas de <i>Salmonella</i> em cultura celular.....	36
3.4.3. Teste invasão das cepas de <i>Salmonella</i> em cultura celular .....	36
3.5. Produção de biofilme em microplaca de poliestireno.....	37
3.6. Teste de sensibilidade de disco-difusão.....	38
3.7. Análises Estatística .....	38

<b>4. RESULTADOS</b> .....	39
4.1. Isolamento de <i>Salmonella</i> spp. das diferentes esteiras no abatedouro .....	39
4.2. Sorotipagem .....	40
4.3. Pesquisa dos genes de virulência em <i>Salmonella</i> .....	42
4.4. Adesão e Invasão das cepas de <i>Salmonella</i> spp. em Hela .....	50
4.5. Produção de biofilme em microplaca de poliestireno.....	50
4.6. Teste de sensibilidade de disco-difusão.....	52
4.7. Tipagem molecular por PFGE .....	52
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	64

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Processo sequencial da formação de biofilme (Zhao et al., 2017) ..... 25
- Figura 2.** Distribuição dos genes de virulência, em cepas de *Salmonella* spp., isoladas de esteiras de um abatedouro de aves..... 42
- Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *invA* (284pb); (b) gene *sopB* (220pb)..... 43
- Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *sopD* (1291pb); (b) gene *sipA* (550pb)..... 44
- Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *sipB* (875pb); (b) gene *sipD* (1029pb) ..... 45
- Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *ssaR* (1628pb); (b) gene *sifA* (449pb) ..... 46
- Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *spvB* (717pb); (b) gene *sitC* (768pb) ..... 47
- Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *iroN* (1205pb); (b) gene *tolC* (161pb)..... 48
- Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *flgK* (1659pb); (b) gene *fljB* (1515pb)..... 49
- Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *flgL* (951pb)..... 50
- Figura 11.** Padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para DNA genômico digerido com XbaI de cepas de *Salmonella* Heidelberg obtidas de esteiras de um abatedouro de aves..... 53
- Figura 12.** Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Heidelberg obtidas de esteiras de um abatedouro de aves..... 53
- Figura 13.** Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Enteritidis obtidas de esteiras de um abatedouro de ..... 54
- Figura 14.** Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Ohio obtidas de esteiras de um abatedouro de aves..... 54

- Figura 15.** Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Mbandaka obtidas de esteiras de um abatedouro de aves..... 55
- Figura 16.** Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Typhimurium obtidas de esteiras de um abatedouro de aves ..... 55
- Figura 17.** Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Agona obtidas de esteiras de um abatedouro de aves..... 56
- Figura 18.** Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Kentucky obtidas de esteiras de um abatedouro de aves..... 56

## LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** *Primers* e suas propriedades utilizados na PCR para detecção dos genes de virulência em *Salmonella* spp ..... 34
- Quadro 2.** Positividade para *Salmonella* spp., ao longo de 20 coletas semanais, em momentos diferentes, nos dois tipos de esteiras, em uma planta de abate de aves, no interior de São Paulo..... 39

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Sorovares de *Salmonella* spp. isolados durante as 20 semanas de coleta, a partir das esteiras de lona e poliestireno, de uma planta de abate de aves, no interior do estado de SP. .... 41
- Tabela 2.** Caracterização genotípica e fenotípica de alguns fatores de virulência das 40 cepas de *Salmonella* spp., isoladas de esteiras de um abatedouro de aves ..... 51
- Tabela 3.** Resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos de *Salmonella* spp., isoladas de um abatedouro de aves..... 52

## RESUMO

*Salmonella* spp. é uma bactéria entérica, responsável por graves doenças de origem alimentar e um dos principais agentes envolvidos em surtos no mundo todo. A contaminação ocorre, principalmente pelo consumo de carne de frango e ovos, uma vez que esses animais podem ser portadores de vários sorovares patogênicos para o homem. O objetivo do estudo foi avaliar o potencial patogênico de 40 cepas de *Salmonella* spp., isoladas de esteiras de um abatedouro de aves, por testes fenotípicos de adesão, invasão e produção de biofilme e análise genotípica da presença de vários genes relacionados com fatores de virulência, além de verificar sua persistência no ambiente e sua susceptibilidade a antimicrobianos por disco-difusão. Foi observada resistência à tetraciclina (17,5%) ampicilina (10%), cefotaxima (7,5%), cotrimoxazol (5%) e cloranfenicol (2,5%). Todas as cepas apresentaram os genes *invA*, *sipB*, *sipD*, *ssaR*, *sifA*, *sitC*, *iroN*, *tolC*, *flgK*, *fljB* e *flgL*. Os genes *sopB* e *sipA* estavam presentes em 92,5% dos isolados, enquanto *sopD* e *spvB* foram observados em 90% e 32,5% das cepas, respectivamente. Todos os isolados aderiram e invadiram células HeLa, com índice de invasão variando de 1,4 a 73,8%. Com relação à produção de biofilme, 31 (77,5%) cepas foram capazes de produzir biofilme em microplacas de poliestireno. Pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), detectou-se a persistência de clones no ambiente por até 18 semanas, entre as 20 amostradas. Não foi possível o estabelecimento de uma correlação entre as taxas de adesão e invasão e a presença/ausência dos genes codificadores de proteínas efetoras envolvidas nesses processos. Além disso, a capacidade dessas cepas em produzir biofilme e com isso, persistirem no ambiente e se dispersarem pelas superfícies de contato na planta de processamento, favorece a contaminação de alimentos de boa qualidade, fato agravado pelo potencial patogênico desses isolados demonstrados pela capacidade de adesão e invasão e pela resistência a vários antimicrobianos.

Palavras-chave: Biofilme, Genes de virulência, Invasão, PFGE, Susceptibilidade a antimicrobianos

## ABSTRACT

*Salmonella* spp. is an enteric bacterium responsible for serious foodborne disease, being one of the main agents involved in outbreaks worldwide. Contamination occurs mainly by poultry and egg consumption once these animals carry some pathogenic serotypes for the human being. Our aim was to evaluate the pathogenic potential of 40 strains of *Salmonella* spp., isolated from poultry slaughterhouse mats, by adhesion and invasion phenotypic tests, and biofilm production, and genotypic analysis to identify genes related to virulence factors, besides we verified its environment persistence and its antimicrobial susceptibility by disc-diffusion. We observed resistance to tetracycline (17.5%), ampicillin (10%), cefotaxime (7.5%), cotrimoxazole (5%) and chloramphenicol (2.5%). All strains possessed *invA*, *sipB*, *sipD*, *ssaR*, *sifA*, *sitC*, *iroN*, *tolC*, *flgK*, *fljB* and *flgL* genes. The genes *sopB* and *sipA* was present in 92.5% of the isolates, while *sopD* and *spvB* were observed in 90% and 32.5% of the strains, respectively. All strains adhered and invaded HeLa cells, with invasion index varying from 1.4 to 73.8%. Regarding to biofilm production, 31 (77.5%) strains were able to produce biofilm on polystyrene microplates. The Pulsed-field gel electrophoresis technique (PFGE) detected the existence of clones in the environment for up to 18 weeks, among de 20 sampled. It was not possible to establish a correlation between adhesion and invasion rates and the presence/absence of effector protein coding genes involved in these processes. In addition, the ability of these strains to produce biofilm and thus persist in the environment and disperse through contact surfaces in the processing plant, favors the contamination of good quality food, a fact aggravated by the pathogenic potential of these isolates demonstrated by the adhesion capacity and invasion and resistance to various antimicrobials.

**Keywords:** Antimicrobial susceptibility, Biofilm, Invasion, PFGE, Virulence genes

## 1. INTRODUÇÃO

*Salmonella* spp. é um dos micro-organismos mais envolvidos em doenças de origem alimentar e sua presença em carcaças e produtos derivados de frangos representa um sério risco à saúde pública.

O mecanismo de patogenicidade de *Salmonella* spp. é multifatorial, complexo e vários fatores de virulência são necessários para a colonização, invasão, sobrevivência e multiplicação intracelular no hospedeiro. A caracterização genotípica e fenotípica possibilita a compreensão do potencial dessas bactérias em causar infecção, contribuindo também para a rastreabilidade da mesma.

### 1.1. Características gerais de *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae, são bacilos Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono e produzir gás a partir da glicose (exceto *Salmonella* Typhi). Produzem ácido sulfídrico a partir da redução do enxofre por ação da enzima cisteína desulfidrase e, em sua maioria, são móveis por flagelos peritríquios, exceto os sorovares *Salmonella* Pullorum e *S. Gallinarum* (Trabulsi e Alterthum, 2015). Essas bactérias estão amplamente distribuídas na natureza e podem estar presentes em várias espécies animais, especialmente nas aves e nos suínos, sendo patogênica para humanos e outros animais (Holt et al., 1994; Hensel, 2004).

A classificação do gênero *Salmonella*, a partir da identificação de antígenos, teve início em 1926, pelos trabalhos desenvolvidos por White e, posteriormente, por Kauffman, em 1930, em estudos que deram origem ao Esquema de Kauffman e White, bastante empregado nos dias atuais e que propõe a divisão do grupo em sorogrupos e sorovares, com base na presença dos antígenos O (somático), H (flagelar) e Vi (capsular) (Bell e Kyriakides, 2002; De Jong et al., 2012).

Os antígenos O são designados através de números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella* spp., Segundo Gorzynski (1997), o polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS) é o principal antígeno de superfície dessas bactérias e sua especificidade antigênica deve-se a unidades repetidas de açúcares (tri, tetra ou

pentassacarídeos). O antígeno capsular está sempre presente no sorovar *S. Typhi* e, ocasionalmente, em *S. Dublin* (Ryan et al., 2017).

Já os antígenos flagelares (H) podem ocorrer nas fases 1 e 2 e são designados por letras minúsculas. Como essa variedade é maior do que a quantidade de letras do alfabeto, a letra z é utilizada com indicadores numéricos (z1, z2, z3). A diferenciação entre as fases 1 e 2 ocorre quando uma célula de *Salmonella* spp. possuidora de um determinado antígeno flagelar se multiplica e dá origem a um clone que expressa outro antígeno flagelar. Os antígenos de fase 1 (ou específica) caracterizam alguns sorovares e os de fase 2, são comuns a vários sorovares. Essa informação constitui um dos atributos utilizados para classificar *Salmonella* spp. (Campos, 2005).

Segundo Guibourdenche et al. (2010), o gênero *Salmonella* consiste de duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*. Os sorovares pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica* são designados por um nome geralmente relacionado com o local geográfico do seu primeiro isolamento, que é escrito em letras romanas normais (não em itálico) e a primeira letra em maiúsculo. Sorovares pertencentes às outras subespécies e a espécie *S. bongori* são designados por seus antígenos, seguidos do nome da subespécie. Atualmente, são descritos 2.659 sorovares (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014).

A subespécie *enterica* é considerada a mais importante, uma vez que a grande maioria dos sorovares isolados de humanos pertence a esse grupo. Do ponto de vista epidemiológico, embora os casos de salmoneloses possam ser causados por diversos sorovares, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são reconhecidos como os principais responsáveis por causar essa infecção em humanos (Moore et al., 2007; Pang et al., 2007; Kottwitz et al., 2010; Fardsanei et al., 2017; Reyes et al., 2017).

*S. Typhi* e *S. Paratyphi* são sorovares específicos dos seres humanos. *S. Typhi* é o agente causador da febre tifóide, uma infecção sistêmica caracterizada por febre alta, dor de cabeça, dor abdominal, náuseas e anorexia. O paciente ainda pode tornar-se um portador desse patógeno e continuar disseminando a infecção. Já *S. Paratyphi* é a responsável pela febre entérica, cujos sintomas clínicos são mais brandos quando comparados aos da febre tifóide podendo evoluir para septicemia. As salmonelas não tifóides, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, podem causar gastroenterite auto-limitada em humanos, bovinos, suínos e aves, bem como bacteremia e infecção

sistêmica em hospedeiros imunossuprimidos (Coburn et al., 2007; De Jong et al., 2012; LaRock et al., 2015).

## 1.2. Salmonelose

A salmonelose é a doença de origem alimentar mais frequente no mundo (Bollaerts et al., 2008; Feasey et al., 2012; Fardsanei et al., 2017) e de acordo com o sorovar envolvido, a concentração do inóculo, os fatores de virulência expressos pelo agente e o estado imunológico do hospedeiro, *Salmonella* spp. pode ocasionar desde uma infecção gastrointestinal branda até septicemia ou morte (Coburn et al., 2007; Verbrugghe et al., 2016; Bierschenk et al., 2017). Os sintomas caracterizam-se por dor abdominal, diarreia, calafrios, febre, vômito, desidratação e dores de cabeça, sendo que o período de incubação pode variar de 5 a 72 horas, frequentemente ocorrendo entre 12 e 36 horas. A recuperação ocorre de 1 a 7 dias após o aparecimento dos sintomas (Bollaerts et al., 2008; Salem et al., 2017).

No Brasil, entre 2007 a 2016, foram notificados 6.632 surtos de doença de origem alimentar com 118.104 pessoas doentes, 17.186 hospitalizações e 109 óbitos. Embora não tenha ocorrido a identificação do agente etiológico em 4.662 dos casos, *Salmonella* foi o micro-organismo mais comumente isolado, com 497 casos (BRASIL, 2017). Nos Estados Unidos, estima-se que a cada ano ocorra, aproximadamente, 1 milhão de casos de salmonelose por salmonelas não-tifóide, com 19.336 pessoas hospitalizadas e 378 óbitos (CDC, 2011).

A dose mínima infectante (DMI) para o homem é incerta, pois o número de micro-organismos necessários para a produção de sintomas pode ser maior que 10 células, dependendo do sorovar envolvido. Em consequência, no Brasil é exigida a ausência de *Salmonella* em 25g do produto final (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; BRASIL, 2001).

De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), o Brasil é o segundo produtor mundial de carne de frango, atrás apenas dos Estados Unidos, e o maior exportador. Otimizando os fatores produtivos, com o aumento da preocupação com a qualidade final do produto, conquista-se cada vez mais mercados (ABEF, 2017).

Devido ao crescimento da indústria avícola, a salmonelose recebeu destaque por causar perdas econômicas em todas as fases de criação. A contaminação das aves pode

ocorrer por transmissão vertical (via ovo) ou no seu ambiente de criação. Após o contato com o micro-organismo, as aves tornam-se portadoras intestinais e eliminam a bactéria nas fezes promovendo a contaminação no abatedouro e comprometendo toda a linha de produção (Andreatti Filho et al., 2001; Andreatti Filho et al., 2011; Marietto-Gonçalves e Andreatti Filho, 2012).

*Salmonella enterica* subespécie *enterica* pode causar três tipos de salmonelose aviária. Baseado em suas diferentes propriedades bioquímicas o sorovar *S. Gallinarum* foi dividido em biovar *Gallinarum* e biovar *Pullorum*. Embora apresentem características similares como, antígenos somáticos idênticos, exclusividade em espécies aviárias e ausência de flagelos, as doenças causadas por esses patógenos apresentam diferentes patogenidades e epidemiologia (Barrow e Freitas Neto, 2011; Batista et al., 2015). O biovar *S. Pullorum* causa a doença do pullorum, sendo responsável pelo elevado índice de morbidade e mortalidade em aves recém-nascida. Nas aves jovens, é possível ocorrer regressão da doença, tornando-as portadoras assintomáticas após o quadro de infecção. A doença causada pelo biovar *S. Gallinarum* é conhecida como tifo aviário, uma doença sistêmica severa, sendo mais comum em aves adultas, mas animais de todas as idades podem ser susceptíveis (Barrow e Freitas Neto, 2011; Batista et al., 2015; Xie et al., 2017). Já as infecções paratifóides podem ser causadas por qualquer sorovar de *Salmonella*. *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Montevideo*, *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Hadar*, *S. Mbandaka*, *S. Thompson* e *S. Senftenberg* têm recebido destaque como sorovares predominantes em aves (Antunes et al., 2016; Paul et al., 2017).

A ocorrência e a quantidade de *Salmonella* presente na carne variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças. Apesar dos avanços tecnológicos, a carne de frango ainda é passível de contaminação bacteriana, especialmente por micro-organismos do gênero *Salmonella*, que se encontram no trato intestinal podendo contaminar as carcaças e outros produtos, caso o processo de abate não seja realizado com os cuidados higiênicos adequados. Em um levantamento em diferentes países, Silva et al. (2004) observaram que de 30 a 50% das carcaças de frangos congelados ou refrigerados estavam contaminados por *Salmonella*. No Brasil, há relatos de contaminação por *Salmonella* em frangos e seus derivados variando de 13,3 a 86,7% (Carvalho e Cortez, 2005; Cardoso et al., 2015).

A salmonelose na avicultura pode causar grandes perdas econômicas devido à mortalidade e redução na produção de ovos, além de ser um problema de saúde pública. Sendo assim, sua prevenção tornou-se uma realidade preocupante para toda a avicultura, tendo em vista que a principal via de contaminação humana é pelo consumo de produtos avícolas contaminados (Salem et al., 2017).

### **1.3. Fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade em humanos**

Para uma melhor compreensão da atuação desses genes de virulência no mecanismo de patogenicidade é necessário conhecer as etapas que fazem parte do processo infeccioso e para isso, os modelos baseados em linhagens celulares são frequentemente usados em ensaios de adesão e invasão como indicadores do potencial patogênico das bactérias (Mellor et al., 2009).

A patogênese da *Salmonella* inclui a adesão à superfície das células do epitélio intestinal do hospedeiro e a invasão e sobrevivência no interior dessas células (Ochoa e Rodríguez, 2005; Gagnon et al., 2013). De maneira geral, as salmonelas penetram no organismo por via oral, pela ingestão de alimentos ou água contaminados e sobrevivem ao ambiente ácido do estômago, às altas concentrações de sais biliares, ao aumento da osmolaridade, às alterações na disponibilidade de nutrientes e íons, à redução da tensão de oxigênio e à competição com a microbiota intestinal do hospedeiro. Esse micro-organismo desenvolveu mecanismos que modulam a expressão fenotípica e genotípica em função das mudanças do ambiente em que se encontra, permitindo sua sobrevivência e multiplicação (LaRock et al., 2015; Trabulsi e Alterthum, 2015; Chakroun et al., 2018).

Ao alcançarem o intestino humano, na porção do íleo terminal e cólon, provocam alterações inflamatórias no epitélio intestinal, incluindo a infiltração de neutrófilos e fluidos no lúmen intestinal, resultando em diarreia. *Salmonella* é capaz de induzir a expressão e a regulação de várias citocinas pró-inflamatórias no epitélio intestinal humano, que desempenham um importante papel no início da resposta inflamatória, como a interleucina-8 (IL-8), que é a principal citocina pró-inflamatória, responsável por ativar neutrófilos durante a resposta imune, sendo secretada pelas células epiteliais intestinais em resposta à entrada bacteriana. Pode-se ainda citar a interleucina-6 (IL-6), que também é secretada por células epiteliais e possui múltiplas funções biológicas tal como a regulação da hematopoiese, inflamação e imunidade. A

diferenciação de células B e macrófagos também está envolvida na resposta de fase aguda (Ghosal et al., 2015; Chakroun et al., 2017). *Salmonella* pode ser fagocitada no lúmen intestinal facilitando a invasão da mucosa intestinal. Porém, a bactéria geralmente induz a sua própria fagocitose por células epiteliais e atravessa a barreira epitelial através de células M das microvilosidades intestinais (LaRock et al., 2015; Trabulsi e Alterthum, 2015). Segundo Hensel (2004), esse patógeno endocitado é capaz de se proliferar no interior de células infectadas do hospedeiro dentro de um compartimento conhecido como “vacúolo contendo *Salmonella*” (SCV). Além disso, dentro das células, as bactérias garantem uma fonte de nutrientes e ficam protegidas da ação de antibióticos (Alva-Murillo et al., 2011).

Essa virulência expressada pelas salmonelas é multifatorial e complexa, incluindo presença de fímbrias, flagelos, proteínas efetoras, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento e produção de endotoxinas (Rodrigues, 2005). Alguns desses fatores são chamados de “clássicos” e podem estar localizados em elementos genéticos móveis, como *transposons*, plasmídeos e bacteriófagos ou fazem parte de regiões específicas do cromossomo da bactéria, nas Ilhas de Patogenicidade (IP) (van Asten e van Dijk, 2005; De Jong et al., 2012).

Em muitas bactérias entéricas, a virulência pode ser conferida por uma única região do genoma, como o plasmídeo de virulência em *Shigella flexneri*. Porém, a capacidade de vida intracelular facultativa de *Salmonella* exige um grande número de genes distribuídos em seu cromossomo (Skyberg et al., 2006). A maioria dos genes relacionados à virulência em *Salmonella* encontra-se nas Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPIs) e em um plasmídeo associado à virulência (pSTV). O operon *spv* localizado em uma região altamente conservada no pSTV tem o papel de potencializar a disseminação sistêmica do patógeno, além de auxiliar na sua replicação em locais extra-intestinais (Fardsanei et al., 2017).

As Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI) são grandes regiões do cromossomo (10 a mais de 100 Kb) que codificam vários fatores de virulência e, até o momento, foram descritas 17 SPIs, sendo que algumas são conservadas para o gênero enquanto outras são específicas de determinados sorovares (Vieira, 2009; Oliveira et al., 2013). Segundo Bessa (2006), esses genes foram adquiridos de outros gêneros bacterianos através da transferência horizontal, aumentando a patogenicidade da *Salmonella* spp. durante sua evolução.

As SPI-1 e SPI-2 são as mais estudadas e ambas codificam o Sistema de Secreção Tipo III (T3SS) que forma um canal na membrana da célula hospedeira, permitindo que proteínas efetoras do citoplasma bacteriano sejam secretadas no interior dessas células (Coburn et al., 2007). Essas proteínas induzem a invasão das células epiteliais através de modificações no citoesqueleto de actina, permitindo a internalização e a proliferação do patógeno (Vieira, 2009; Trabulsi e Alterthum, 2015).

Na SPI-1 estão localizados os genes necessários para invasão de células não fagocíticas e os envolvidos na secreção do T3SS. Embora inicialmente caracterizada como uma ilha de invasão, alguns genes aí localizados possuem funções adicionais relacionadas à ativação de vias imunes inatas (Coburn et al., 2007), bem como o envolvimento do *cluster* do gene *sit*, na captura de ferro (Fortes et al., 2012).

O operon *inv* (*invasibility*), presente na SPI-1, é composto de sete genes *invABCDEFG*. O gene *invA* é o primeiro no operon, desempenhando função importante na invasão de células epiteliais (Turki et al., 2012, Oliveira et al., 2013).

O gene *sipA* codifica a proteína SipA, que provoca o rearranjo na actina da parede da célula alvo, formando poros que permitem a translocação das proteínas. SipBCD possuem um papel na translocação de outras proteínas efetoras. Entretanto, o gene *sipB* é responsável pela indução de apoptose em macrófagos, pela ativação da caspase-1 e SipC também exerce um papel no agrupamento da actina (Hansen-Wester e Hensel, 2001; Campioni et al., 2012; Oliveira et al., 2013).

A SPI-1, juntamente com genes adicionais localizados externamente, codificam as proteínas SptP, SopE e SopE2, que interferem com a função de proteínas celulares de uma família de pequenas GTPases do hospedeiro (Cdc42, Rac-1 e Rho) que regulam a formação de filamentos de F-actina e a dinâmica do citoesqueleto, além disso a interação dessas proteínas com Rho GTPases das células epiteliais ativa o fator nuclear kappa  $\beta$  (NF- $\kappa\beta$ ), podendo levar à liberação de citocinas pró-inflamatórias (LaRock et al., 2015; Ilyas et al., 2017).

As proteínas efetoras SopA, SopB e SopD estão relacionadas com os sintomas de diarreia. A proteína SopB, uma fosfatase de inositolfosfato, estimula a perda de eletrólitos e a secreção de fluídos das células epiteliais para o lúmen intestinal (Hansen-Wester e Hensel, 2001; Wood et al., 2004) e, assim como SopE, também exerce um papel na promoção de respostas inflamatórias (Hu et al., 2017a; Ilyas et al., 2017).

A maioria das proteínas efetoras secretadas pela SPI-1 (SopA, SopB, SopE, SopE2, SipA e SipC) colaboram com o estabelecimento do processo inflamatório por

intermédio da produção de IL-8 através da ativação da cascata de fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e NF- $\kappa$ B, causando a desestabilização das *zonulas ocludens* e a migração de neutrófilos para o lúmen intestinal (LaRok et al., 2015).

A SPI-2 está ligada à capacidade da *Salmonella* em sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro dos SCV nas células eucarióticas (Fortes et al., 2012; Trabulsi e Alterthum, 2015). Também está envolvida na indução da enterocolite e na doença sistêmica (Coburn et al., 2007). Ao contrário da SPI-1, que está presente em ambas as espécies *S. enterica* e *S. bongori*, a SPI-2 só foi detectada em *S. enterica*, sugerindo que seja uma aquisição recente (Hansen-Wester e Hensel, 2001; Fortes et al., 2012). Os genes *ssaR* e *sifA* permitem a sobrevivência e replicação bacteriana dentro das células hospedeiras. A proteína efetora SifA é responsável por manter a integridade da membrana fagocítica da SCV durante a proliferação intracelular (Almeida et al., 2013; Campioni et al., 2012; Fortes et al., 2012).

Há poucas informações sobre as demais SPIs. Sabe-se que a SPI-3 está envolvida na adesão inicial e na sobrevivência durante a disseminação sistêmica e que o principal fator de virulência codificado por ela é um sistema de transporte de alta afinidade com Magnésio (MgCB). Já os genes da SPI-4 são necessários para a fase intestinal da doença e para codificação de adesinas não fimbriais, o que pode contribuir para a persistência em longo prazo (Fortes et al., 2012; Trabulsi e Alterthum, 2015).

A SPI-5 codifica proteínas efetoras para os T3SS codificados por SPI-1 e SPI-2 e media a inflamação e secreção de cloro, caracterizando a fase enteropatogênica, além de codificar o gene *sopB*. SPI-7 é específica dos sorovares *S. Typhi*, *S. Dublin* e *S. Paratyphi*. É nessa ilha que o antígeno Vi é codificado e é também onde se encontra o fago *sopE* que codifica a proteína efetora SopE do T3SS da SPI-1 (Schmidt e Hensel, 2004; Fortes et al., 2012).

As demais SPIs estão relacionadas com a codificação de fímbrias, resistência a várias bacteriocinas, produção de toxinas e sobrevivência da bactéria no interior do macrófago, contribuindo para a infecção sistêmica (Oliveira et al., 2013; Ilyas et al., 2017).

Os genes *flgK*, *fljB* e *flgL* codificam proteínas associadas aos flagelos. Já o *spvB* pode aumentar a taxa de crescimento nas células hospedeiras e afetar a interação da *Salmonella* com o sistema imune do hospedeiro (Campioni et al., 2012; Almeida et al.,

2013). Os genes *sitC* e *iroN* estão envolvidos na aquisição de ferro e o *tolC*, no reconhecimento e invasão da célula hospedeira (Mezal et al., 2013).

Os biofilmes também são considerados um fator de virulência, uma vez que eles protegem os micro-organismos envolvidos na sua matriz, aumentando a resistência à ação de antimicrobianos e sanitizantes e permitindo a sua propagação no ambiente. A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre, não com as células individualizadas crescendo de maneira planctônica, em suspensão, mas com as bactérias organizadas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a diversas superfícies, geralmente compondo um biofilme. Esses biofilmes são constituídos por células aderidas a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica), embebidas numa matriz de exopolissacarídeos (EPS), constituídas principalmente por polissacarídeos e proteínas. Modificações dos componentes das EPSs podem interferir na formação do biofilme e na virulência dos patógenos associados a ele (Zhao et al., 2017).

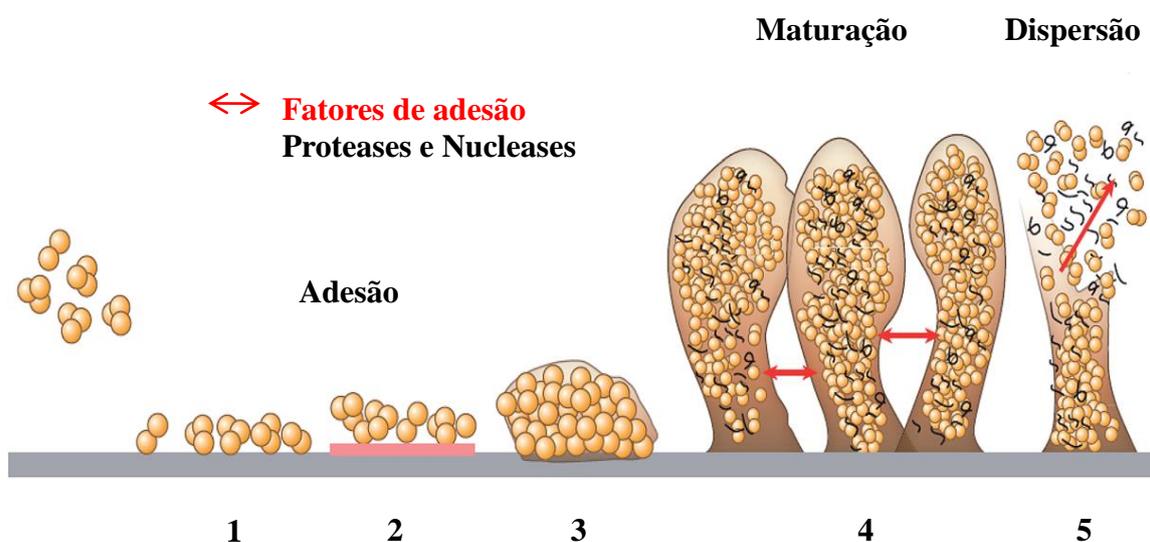
Os biofilmes são encontrados em diversas superfícies, como alimentos, equipamentos de processamento de alimentos, tubulações de água e industriais, ventilação, dispositivos médicos e tecidos vivos (Zhao et al., 2017). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis. Dessa forma, constituem um aspecto fundamental da ecologia e biologia bacteriana (Wong e O'toole, 2011).

A formação de biofilmes pode ser influenciada por fatores ambientais, como açúcares ou proteases presentes no meio de crescimento, concentrações de ferro, cálcio, manganês, oxigênio e carbono, temperatura, pH e osmolaridade (Melchior et al., 2009; Zhao et al., 2017).

Existem diferentes teorias para a formação de um biofilme, sendo que a primeira foi proposta por Marshall et al. (1971), onde o processo ocorreria em duas etapas. Na primeira etapa, a adesão dos micro-organismos à superfície seria reversível, pois os mesmos estariam ligados fracamente à superfície, mantidos por interações físico-químicas não específicas. Na segunda etapa, a adesão se tornaria irreversível, pois o tempo de contato seria maior, com produção de uma matriz extracelular de natureza polissacarídica e/ou proteica.

A teoria mais recente e aceita para a formação de biofilmes é caracterizada por um processo sequencial de adesão bacteriana, formação de micro-colônias e secreção de

substâncias que formam a matriz, essencialmente constituída de EPS, mas que também poderia conter proteínas de superfície responsáveis pela adesão bacteriana, seguido pelo desenvolvimento precoce da arquitetura do biofilme e sua maturação (Stoodley et al., 2002; Cue et al., 2012; Joo e Otto, 2012; Zhao et al., 2017). Após a estabilização do biofilme, algumas bactérias podem se desprender da camada mais externa e aderir ao ambiente circundante, permitindo que o biofilme se espalhe e se estabeleça ao longo da superfície (Hall-Stoodley e Stoodley, 2005; Lasa, 2006; Zhao et al., 2017), conforme Figura 1.



**Figura 1.** Processo sequencial da formação de biofilme. 1. Adesão inicial; 2. Formação de microcolônias; 3. Produção de EPS; 4. Maturação; 5. Dispersão de células planctônicas (Zhao et al., 2017).

Tanto o despreendimento de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme como o desenvolvimento primário e a maturação são dependentes da densidade populacional e modulação da expressão gênica, controlados por moléculas sinalizadoras, no processo denominado *quorum sensing* (Waters e Bassler, 2005; Zhao et al., 2017).

Os biofilmes têm importante papel na sobrevivência de *Salmonella* sob condições ambientais desfavoráveis, graças às fímbrias agregativas e à produção de celulose que formam a matriz extracelular (Gerstel e Römling, 2003; Wang et al., 2013). Fímbrias bacterianas e celulose estão entre os principais componentes do biofilme de *Salmonella* (Oliveira et al., 2014). As fímbrias desempenham um papel importante na adesão de *Salmonella* spp. à superfície da célula alvo e já foram identificados pelo menos 20 operons distintos no genoma de *Salmonella* spp.

relacionados com a produção de fímbrias (Collighan e Woodward, 2001). Já a celulose desempenha um papel estrutural conferindo proteção mecânica, química e biológica contra o meio em que está inserido o biofilme ou facilitando o processo de adesão celular (Solano et al., 2002).

Há ainda diversos genes e proteínas envolvidos na fixação bacteriana, motilidade, detecção e resposta à disponibilidade de oxigênio, regulação gênica global, transporte e resposta ao estresse, que são diferentemente expressos em biofilmes quando comparados às células planctônicas (Hamilton et al., 2009). O gene *csgD* regula outros genes envolvidos na formação de biofilme por *Salmonella* spp. (Gibson et al., 2006). Foi demonstrado que esse gene controla positivamente a regulação das fímbrias e a ativação da produção de celulose da matriz extracelular em *S. Typhimurium*, resultando na formação de uma matriz extracelular espessa (Zogaj et al., 2000; Gerstel e Römling, 2003). Esse gene estimula indiretamente a produção de celulose, através da ativação da transcrição do gene *adrA*, que por sua vez, estimula a produção de uma proteína homônima, que afeta positivamente a atividade enzimática da maquinaria biosintética da celulose. A co-expressão dos dois componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella* spp. leva à formação de uma rede altamente hidrofóbica com células compactadas, alinhadas formando uma matriz rígida (Zogaj et al., 2000).

#### **1.4. Resistência a antibacterianos**

A gastroenterite causada por *Salmonella*, na maioria dos casos é auto-limitada e sem a necessidade de antibioticoterapia. Porém, em alguns casos especiais, como pacientes imunodeprimidos, a infecção pode progredir para uma doença sistêmica, como bacteremia, meningite e endocardite, sendo necessário o uso de antimicrobianos (Fardsanei et al., 2016). Entretanto, o aumento de sorovares resistentes a tais fármacos, incluindo resistência a quinolonas, fluoroquinolonas e a cefalosporina de terceira geração, tornou-se um grande motivo de preocupação por representar um problema de saúde pública (Hur et al., 2012; Utrarachkij et al., 2016; El-Tayeb et al., 2017).

Alguns antimicrobianos usados no tratamento de infecções em humanos são utilizados também como tratamento terapêutico de animais doentes e como promotores do crescimento e seu uso indiscriminado tanto em humanos quanto em animais pode causar resistência aumentada em populações bacterianas (Pande et al., 2015; Nulty et al., 2016; Hu et al., 2017b; Mathole et al., 2017). Como consequência, os alimentos de

origem animal podem abrigar patógenos resistentes aos antibióticos e atuar como um veículo na disseminação dessas cepas para o homem (Fardsanei et al., 2017; El-Tayeb et al., 2017).

A resistência antimicrobiana em *S. enterica* é atribuída a vários mecanismos como a alteração da permeabilidade de membrana ou da parede celular, expulsão ativa do antibiótico para o exterior da célula, degradação enzimática de alguns agentes antimicrobianos e alteração do local de ações de drogas (El-Tayeb et al., 2017).

Sabe-se que os genes de resistência antimicrobiana podem ser transferidos horizontalmente entre bactérias por transdução, conjugação ou transformação e que o genótipo da resistência antimicrobiana depende de mais de um gene e a expressão pode variar dependendo das condições (Sanchez-Maldonado et al., 2017; O'Bryan et al., 2018). A resistência às penicilinas e cefalosporinas por *Salmonella* spp. ocorre pela presença da enzima  $\beta$ -lactamase, que atua degradando a estrutura química dos agentes antimicrobianos. Já a resistência à quinolona foi inicialmente atribuída a mutações pontuais no gene *gyrA*, que codifica a subunidade A da girase, cujo complexo com DNA é o principal alvo das quinolonas. A combinação de dois principais mecanismos de resistência, múltiplas mutações de genes alvos e efluxo ativo mediado por AcrAB-TolC, é a responsável pela resistência às fluoroquinolonas (Hur et al., 2012; Kao et al., 2017).

Poole (2005) observou que a resistência aos aminoglicosídeos em *Salmonella* está associada às enzimas fosfotransferases, acetiltransferases e adeniltransferases de aminoglicosídeos que funcionam por fosforilação, acetilação e adenilação de certos aminoglicosídeos, respectivamente. A resistência à tetraciclina e ao cloranfenicol está altamente associada à aquisição e expressão de bombas de efluxo, que reduzem os níveis tóxicos do fármaco nas células bacterianas (Hur et al., 2012). A resistência ao cloranfenicol em *Salmonella* também está associada à modificação do alvo do medicamento por acetiltransferases de cloranfenicol codificadas pelos genes *cat* (Murray e Shaw, 1997).

O perfil de resistência a agentes antimicrobianos tem sido usado como um meio de acrescentar informação no processo de tipificação de linhagens bacterianas. O monitoramento desse dado fornece informações sobre a situação das populações bacterianas em diferentes áreas geográficas e ao longo do tempo (Bessa, 2006; Utrarachkij et al., 2016).

Portanto, a detecção e o monitoramento de cepas de *Salmonella* multirresistentes são importantes para a escolha adequada de antibacterianos para o tratamento da salmonelose grave e sistêmica e para avaliar o risco de propagação dessas linhagens (Yang et al., 2002).

### **1.5. Caracterização molecular por eletroforese em gel de campo pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis, PFGE)**

A identificação e caracterização genotípica dos isolados bacterianos são essenciais para a vigilância epidemiológica e investigação de surtos, a fim de identificar a fonte, implementar medidas de controle e/ou tomar ações para remover o alimento contaminado do mercado (Torpdahl et al., 2005; Bopp et al., 2016; Ziebell et al., 2017). Alguns métodos moleculares são empregados para relacionar a origem de vários microorganismos (clones). A presença de sequências genômicas conservadas e com variabilidade podem ser acessadas pela clivagem ou amplificação do material genético permitindo caracterizar segmentos de DNA de tamanho e composição variáveis que podem ser interpretados em corridas eletroforéticas e sequenciamento gênico (Tenover et al., 1997; Weber et al., 1997).

O PFGE foi descrito como a técnica mais utilizada para tipagem e é usado para proporcionar uma maior discriminação entre os agentes patogênicos (Bopp et al., 2016), sendo uma importante ferramenta para a caracterização molecular de *Salmonella* (Barrett et al., 2006). O PulseNet é um programa em rede que conecta os principais laboratórios de referência nos Estados Unidos e disponibiliza protocolos padronizados da técnica de PFGE para *Salmonella* e outros patógenos transmitidos por alimentos (Barco et al., 2013).

Esse método molecular de tipagem baseia-se na separação de fragmentos de DNA obtidos por digestão dos cromossomos com endonucleases de restrição. O padrão de bandas gerado (pulsotipo) pode ser observado visualmente, quando poucos isolados são analisados ou através do BioNumerics, um softwarer específico (Tenover et al. 1995; Barco et al., 2013). As enzimas de restrição mais utilizadas em *Salmonella* incluem XbaI, BlnI ou SpeI e como padrão de peso molecular “universal” na normalização de impressões digitais de PFGE, é utilizado o DNA de *S. Braenderup* H9812 (ATCC BAA – 664) restrito com XbaI (Foley et al., 2009).

Entretanto, observou-se a partir da literatura consultada que algumas cepas de *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium difficile* não são tipáveis devido à degradação do DNA pela produção de radicais Tris reativos durante a corrida eletroforética. Porém, a adição de tiourea ao tampão de eletroforese pareceu resolver esse problema (Liesegang e Tschäpe, 2002; Murase et al., 2004; Goering, 2010).

Os protocolos padronizados de PFGE podem ser usados para atingir uma alta reprodutibilidade interlaboratorial, tornando-o útil no desenvolvimento, manutenção e compartilhamento entre bancos de dados nacionais e internacionais, como PulseNet-USA e PulseNet-Europe. Porém, esse método é laborioso e muitas vezes requer de 2 a 4 dias para realização dos procedimentos e análise dos resultados (Foley et al., 2009). Além disso, se um "evento" genético não afetar a mobilidade eletroforética do fragmento de DNA digerido com enzima, a mudança pode não ser identificada como um genótipo alterado (Foley et al., 2007).

Considerando a importância de *Salmonella* na cadeia produtiva de aves, seu potencial patogênico para infecção em humanos, e a capacidade de transmissão cruzada entre alimentos, conhecer o perfil de virulência, de sensibilidade e diversidade destes patógenos pode fornecer informações sobre sua disseminação e propor medidas de controle.

## **2. OBJETIVOS**

Avaliar o potencial patogênico de *Salmonella* spp., previamente isoladas de esteiras de um abatedouro de aves, por testes fenotípicos de adesão, invasão e produção de biofilme e análise genotípica da presença de vários genes relacionados com esses fatores de virulência, além de verificar sua persistência no ambiente e sua susceptibilidade a antimicrobianos.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Obtenção das cepas de *Salmonella* spp.

Nesse estudo, foram utilizadas 40 cepas isoladas em um trabalho anterior, a partir de dois tipos de esteiras, de um abatedouro de frango sob Inspeção Federal localizado na cidade de Itapetininga, São Paulo (Quadro 1). As cepas foram sorotipadas pelo Instituto Oswaldo Cruz (FioCruz), no Rio de Janeiro.

Foram coletadas 120 amostras da superfície de cada um dos dois tipos de esteira, (poliestireno e lona), presentes na sala de cortes do abatedouro. As amostras foram coletadas aleatoriamente das mesmas esteiras e que transportavam o mesmo produto, coxa e sobrecoxa. O intervalo de coleta foi estabelecido conforme o cronograma de produção do abatedouro, sendo a primeira realizada antes do início da produção (I), uma durante as atividades da manhã (II), uma logo após a parada para o almoço (III), uma no início das atividades da tarde (IV), uma durante a produção da tarde (V) e a última após o término das atividades (VI). Durante a parada para o almoço (entre os momentos III e IV), era realizada a limpeza da sala, com a lavagem dos equipamentos e superfícies com água quente (temperatura inferior a 60°C) e somente após o término das atividades era efetuado o procedimento completo de higienização, com a lavagem e utilização de detergentes e sanitizantes.

A coleta foi realizada com o auxílio de esponja estéril pré-hidratada em 10 mL de água peptonada tamponada. Para a padronização da área de coleta, a esponja tocava a esteira durante 10 segundos, tendo em vista a impossibilidade da parada do equipamento durante a produção. Logo após a coleta, as esponjas eram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, onde era adicionado o volume restante de água peptonada, completando 100 mL e o material era acondicionado em caixa isotérmica. Para o isolamento de *Salmonella* spp., a esponja foi homogeneizada em *Stomacher* (Seaward) por dois minutos nos 100 mL de água peptonada tamponada, em um saco plástico estéril. Após esse período, o homogeneizado foi incubado a 35°C/24h. A seguir, 1 mL foi transferido para um tubo de ensaio contendo 10 mL de caldo tetratonato ao qual era adicionado um volume de 0,2 mL de iodeto de potássio a 0,1% imediatamente antes do uso. O tubo foi incubado a 35°C/24h. Outra alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis e incubado a 42°C/24h. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas de Petri contendo Agar Xilose-

Lisina-Desoxicolato (XLD) e placas contendo Agar *Salmonella-Shigella* (SS). Após incubação a 35°C/24h, as colônias características de *Salmonella* spp. foram isoladas e repicadas para tubos de ensaio contendo Agar Tríplice Açúcar Ferro inclinado (TSI) e em tubos com Agar Fenilalanina inclinado, sendo os mesmos incubados a 35°C/24h, como forma de triagem bioquímica do agente. Cepas com resultado compatível para *Salmonella* foram submetidas a testes bioquímicos complementares, empregando-se o sistema API-20E (Biomérieux). Após leitura positiva no API-20E, as cepas foram testadas frente ao soro polivalente, somático e flagelar (Probac do Brasil).

### **3.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR) na pesquisa dos genes envolvidos na virulência de *Salmonella* spp.**

#### **3.2.1. Extração de lisado bacteriano contendo DNA**

A extração e purificação de DNA ocorreu segundo Arnold et al. (2004) com modificações. As cepas de *Salmonella* foram inoculadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) a 37°C/24h. A seguir, 1 mL foi transferido para um tubo de microcentrífuga, para centrifugação a 10.000g/10min. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, ressuspensionado em 1 mL de PBS (Solução Tampão de Fosfato – 0,01 M, pH 7,2). Esse passo foi repetido mais duas vezes, com tempo de centrifugação de 5 minutos. A seguir, o sedimento foi ressuspensionado em 200 µL de água ultrapura estéril e incubado em banho-maria a 95°C/10min. Ocorreu nova centrifugação a 13.000g/5min e o sobrenadante foi congelado a - 20°C até o momento do uso para a reação em cadeia pela polimerase (PCR).

#### **3.2.2. Amplificação do DNA**

Para as reações de PCR foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,2 mL num volume total de 25 µL, utilizando-se GoTaq Green Master Mix, 2X (Promega), conforme recomendações do fabricante. A incubação foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem), empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C/5min para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos de 94°C/30s, temperaturas de anelamento/30s (Quadro 1) e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C/4min. Em todas as reações realizadas foi utilizado um

controle negativo, pela substituição do ácido nucléico por água ultrapura. Como controle positivo foi utilizado uma cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 (ARNOLD et al., 2004).

### 3.2.3. Visualização dos produtos amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese (Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com SYBR Safe (Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (100 – 1.000 Base Pair Ladder – Promega) e de DNA 1kb (250 – 10.000 Base Pair Ladder – Promega), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha Easy FC Software – Alpha Inotech Corporation).

Quadro 1: *Primers* e suas propriedades, utilizados na PCR para detecção dos genes de virulência em *Salmonella* spp.

Gene	Sequência (5' - 3')	Tamanho produto (pb)	Temperatura anelamento	Referência
<i>invA</i> F <i>invA</i> R	TCATCGCACCGTCAAAGGAAC CACGATATTGATATTAGCCCG	284	60°C	Arnold et al., 2004
<i>sopB</i> F <i>sopB</i> R	CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	220	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>sopD</i> F <i>sopD</i> R	ACGACCATT TGC GGCG GAGACACGCTTCTTCG	1291	56,5	Hur et al., 2011
<i>sipA</i> F <i>sipA</i> R	CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>sipB</i> F <i>sipB</i> R	GGACGCCGCCCGGGAAAAACTCTC ACACTCCCGTCGCCGCTTCACAA	875	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>sipD</i> F <i>sipD</i> R	ATGCTCCTTGCAGGAAGCTTTTG TTAATATTCAAAATTATCCG	1029	53°C	Shah et al., 2011
<i>ssaR</i> F <i>ssaR</i> R	GTTCCGATTCAATTGCTTCGG TCTCCAGTGACTAACCCCTAACCAA	1628	50°C	Hur et al., 2011
<i>sifA</i> F <i>sifA</i> R	TTTGCCGAACGCGCCCCACACG GTTGCTTTTCTTGCCTTTCCACCCATCT	449	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>spvB</i> F <i>spvB</i> R	CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	717	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>sitC</i> F <i>sitC</i> R	CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>tolC</i> F <i>tolC</i> R	TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC CCGCGTTATCCAGGTTGTTGC	161	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>iroN</i> F <i>iroN</i> R	ACTGGCACGGCTCGCTGTCGCTCTAT CGCTTTACCGCCGTTCTGCCACTGC	1205	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>flgK</i> F <i>flgK</i> R	ATGTCCAGCTTGATTAATCAC GCGAATATTCAATAACGCATC	1659	53°C	Shah et al., 2011
<i>fljB</i> F <i>fljB</i> R	ATGGCACAAGTCATTAATACAAAC ACGCAGTAAAGAGAGGAC	1515	53°C	Shah et al., 2011
<i>flgL</i> F <i>flgL</i> R	ATGCGTATCAGTACCCAGATG CCGTTCAACTGGAAAAGC	951	53°C	Shah et al., 2011

pb: pares de bases

### 3.3. Caracterização molecular por PFGE.

As cepas foram analisadas pela técnica de PFGE, segundo o protocolo padrão do PulseNet ([www.cdc.gov/pulsenet](http://www.cdc.gov/pulsenet)).

As cepas foram semeadas em placas de TSA e incubadas a 35°C/24 horas. Em seguida, foram preparadas as suspensões bacterianas em tampão de suspensão celular

(Tris 100 mM, EDTA 100m, pH:8,0) de modo a obter uma densidade ótica de 0,8 a 1,0 em espectrofotômetro a 610nm. Após esse procedimento, 200 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo de microcentrífuga, adicionado de 10 µL de proteinase K (20mg/mL) e homogeneizada ao mesmo volume de agarose low melting a 1,2% em solução de Tris-EDTA (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH:8,0). A mistura foi colocada em moldes de plástico, que acompanham o aparelho Chef Mapper (Bio-Rad). Os plugs foram transferidos para uma solução de lise (Tris 50mM, EDTA 50mM, pH8,0: 1% de sarcosyl, 0,1mg/mL de proteinase K) e as células foram mantidas nessa solução a 54°C/2h e em agitação constante de 120rpm. Após esse período, os plugs de agarose foram lavados 2 vezes por 15 minutos com água ultrapura estéril e 4 vezes com tampão TE por 15 minutos e, a seguir, estocados em tampão TE a 4°C.

A partir do plug de agarose, foi retirada uma fatia de, aproximadamente, 2mm que foi mantida em 200 µL de tampão de restrição por 10 min, seguida da digestão a 37°C/2h, com 50 unidades da enzima de restrição XbaI. Após a digestão, os plugs foram colocados em gel de agarose low melting a 1,0% em tampão TBE (0,5x) e a corrida ocorreu utilizando-se o Chef Mapper (Bio-Rad), com os parâmetros de: pulso inicial de 2,2 segundos, pulso final de 63,8 segundos, voltagem de 6V/cm e ângulo de 120°, no total de 18 horas. Além disso, para a corrida de PFGE o tampão de eletroforese foi suplementado com 50 µM de tiourea. Ao término da corrida, o gel foi corado com SYBR Safe (Invitrogen) e analisado e fotografado em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha Easy FC Software – Alpha Inotech Corporation). As imagens foram submetidas ao software Bionumerics (versão 7.6), para comparações dos produtos da digestão e o agrupamento foi feito pelo método de clusterização UPGMA usando o coeficiente de Dice. Os fragmentos de DNA da ATCC BAA-664 (*S. Braenderup H9812*) foram usados como marcadores de peso molecular para os padrões de digestão XbaI.

### **3.4. Teste da capacidade de adesão e invasão das cepas de *Salmonella* spp. em cultura celular**

#### **3.4.1. Cultivo de células HeLa**

As células foram mantidas em meio Eagle Modificado por Dubelcco (DMEM), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). A cultura foi mantida em garrafas a

37° C/5-7 dias, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Para o subcultivo, as células foram separadas utilizando-se uma solução de tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) e ressuspensas em DMEM com 10% de SFB.

#### 3.4.2. Teste adesão das cepas de *Salmonella* em cultura celular

A metodologia para o teste de adesão foi realizada de acordo com Mellor et al. (2009), com modificações. O crescimento das células foi realizado como descrito anteriormente, em microplacas de 24 poços, até a formação do tapete celular. Os poços das placas foram lavados quatro vezes com PBS<sup>+</sup> (suplementado com 0,1 g/L de CaCl<sub>2</sub> e 0,2 g/L de MgCl<sub>2</sub>), removido por sucção a vácuo. As culturas de *Salmonella*, crescidas a 37°C/24h em caldo BHI foram diluídas em DMEM até a obtenção de uma suspensão bacteriana contendo, aproximadamente, 1,5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL, conforme confirmado por contagem em placa, após incubação a 37°C/18h. Depois da lavagem, 1 mL da suspensão bacteriana foi adicionado em duplicata nos poços e a placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 2 horas, o sobrenadante foi removido e cada poço foi lavado com 1 mL de PBS<sup>+</sup>, por 4 vezes, para remover as bactérias não aderidas. A seguir, as células aderidas foram destacadas da placa pela adição de 500 µL de tripsina-EDTA (0,1%/0,04%) por poço e as placas foram incubadas a 37°C/15 minutos em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, a suspensão de cada poço foi homogeneizada por pipetagem e o desprendimento das células foi verificado utilizando-se um microscópio de contraste de fase invertida. A seguir, a tripsinização foi interrompida pela adição de 500 µL de meio Eagle, sem antibiótico. Então, 10 µL do conteúdo dos poços foram semeados em placas de ágar TSA pela técnica de gota em superfície e 1 mL foi passado para um tubo contendo 9 mL de solução salina 0,85% estéril, a partir do qual foram realizadas diluições seriadas, das quais 10 µL foram plaqueados, pela mesma técnica. Após 24 horas de incubação a 37°C, as unidades formadoras de colônias foram contadas, representando a recuperação das bactérias que estavam aderidas às células.

#### 3.4.3. Teste invasão das cepas de *Salmonella* em cultura celular

Os testes de invasão foram realizados segundo o ensaio descrito por Gagnon et al. (2013) com algumas modificações. Conforme descrito para os testes de adesão, as

placas contendo a cultura celular foram lavadas 4 vezes com tampão PBS<sup>+</sup> e foi adicionado 1 mL da suspensão de, aproximadamente,  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL em cada poço. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, as monocamadas foram lavadas 4 vezes com 1 mL de tampão PBS<sup>+</sup>. Após a lavagem foi adicionado, em cada poço, 1 mL de DMEM com 5% de SFB e 300 µg/mL de gentamicina, para eliminar as bactérias extracelulares e a placa foi reincubada a 37°C/2h em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, os poços foram lavados 4 vezes com 1 mL de PBS<sup>+</sup> e 10 µL da última lavagem foram plaqueados em ágar TSA para verificar a ausência de bactérias no meio extracelular. A seguir, 1 mL de Triton X-100 0,1% (vol/vol) foi adicionado aos poços para lisar as células e liberar as bactérias que as invadiram. Na sequência, 10 µL retirados diretamente dos poços e das diluições seriadas foram semeados em TSA pela técnica de gota em superfície, como descrito para o teste de adesão. O resultado positivo foi determinado pela recuperação e contagem das colônias, em relação ao percentual dos valores determinados no teste de adesão.

### **3.5. Produção de biofilme em microplaca de poliestireno**

A verificação e quantificação de biofilme em microplaca de poliestireno foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Stepanović et al. (2003). As cepas de *Salmonella* foram incubadas em caldo BHI, a 35°C/24h. A seguir, a cultura foi diluída a, aproximadamente,  $1,5 \times 10^8$  UFC (0,5 na escala de MacFarland), com o auxílio do Densicheck (Biomeriéux), usando-se o mesmo caldo, acrescido de 0,5% de glicose. Uma alíquota de 300 µL foi semeada em quadruplicata, em microplaca de 96 poços. Após incubação de 96 horas, a placa foi lavada três vezes, com PBS (pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com violeta cristal 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, para a remoção do excesso de corante, o biofilme foi ressuspendido em 200 µL de ácido acético glacial a 33% (v/v), por 10 minutos, e sua densidade óptica (DO) lida em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX) a 570nm. Os testes foram realizados em triplicata.

A partir da média das quatro repetições (DO) e de acordo com a relação entre DO e DOc (controle negativo), as amostras foram classificadas segundo Stepanović et al. (2000), em não produtor de biofilme ou produtor fraco, moderado ou forte, de acordo com a seguinte fórmula:

$DO \leq DOc =$  não produtor de biofilme  
 $DOc < DO \leq (2 \times DOc) =$  fraco produtor de biofilme  
 $(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc) =$  moderado produtor de biofilme  
 $(4 \times DOc) \leq DOc =$  forte produtor de biofilme

### 3.6. Teste de sensibilidade de disco-difusão

O teste de sensibilidade de disco-difusão foi realizado de acordo com Bauer et al. (1966), com interpretação conforme recomendações do CLSI (2012), utilizando discos impregnados com ampicilina (10 $\mu$ g), cotrimoxazol (10 $\mu$ g), cloranfenicol (30 $\mu$ g), ciprofloxacina (5 $\mu$ g), cefotaxima (30 $\mu$ g), gentamicina (10 $\mu$ g) e tetraciclina (30 $\mu$ g) (Kakatkhar et al., 2011; Turki et al., 2012; Campioni et al., 2012; Bolton et al., 2013).

Uma suspensão de cada isolado, crescida em caldo BHI 35°C/6h com, aproximadamente, 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml (escala 0,5 de McFarland) foi semeada com uma zaragatoa na superfície da placa de Müeller-Hinton Agar. Após absorção do inóculo pelo meio de cultura, os discos impregnados com os antimicrobianos foram dispostos na superfície da placa, incubada 35°C/24h. De acordo com o diâmetro do halo formado pelo antimicrobiano, a amostra foi classificada em sensível, intermediária ou resistente. A cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle (CLSI, 2012).

### 3.7. Análise Estatística

A proporção de amostras positivas de *Salmonella* obtidos dos dois tipos de esteiras foi submetida ao teste de Regressão Logística adotando-se o nível de significância de 5%.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Isolamento de *Salmonella* spp. a partir dos diferentes materiais das esteiras no abatedouro.

Entre as 240 amostras coletadas aleatoriamente a partir dos dois tipos de esteiras (lona e poliestireno), no decorrer das 20 semanas, isolou-se 40 cepas de *Salmonella*. Após análise estatística, observou-se que houve diferença significativa ( $p = 0,0048$ ) em relação a esses materiais das superfícies das esteiras presentes na sala de cortes do abatedouro mostrando que a chance de isolar *Salmonella* no poliestireno é 3 vezes maior que lona.

Quadro 2. Positividade para *Salmonella* spp, ao longo de 20 coletas semanais, em momentos diferentes, nos dois tipos de esteiras, em uma planta de abate de aves, no interior do estado de São Paulo.

		Semanas de coletas																			
Esteira	M	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Lona	I									X											
	II			X																	
	III								X									X			
	IV			X						X		X				X					
	V				X					X											
	VI									X											
Poliestireno	I																				
	II		X	X			X			X											
	III				X		X	X			X						X				
	IV			X					X	X						X		X			X
	V						X				X	X	X	X						X	X
	VI								X	X	X	X	X			X		X			

Legenda: M: Momento da coleta (em semanas); (I): antes do início da produção; (II): durante a produção da manhã; (III): após a parada para o almoço; (IV): no retorno das atividades da tarde; (V): durante a produção da tarde; (VI): imediatamente após o término das atividades.

## 4.2. Sorotipagem

De acordo com a sorotipagem realizada pelo Instituto Oswaldo Cruz (FioCruz, RJ), foram isolados 11 sorovares diferentes, sendo 11 *S. Heidelberg* (27,5%), 7 *S. Enteritidis* (17,5%) e 5. *S. Ohio* (12,5%), seguido de 4 *S. Mbandaka* (10%), 3 *S. Agona* e 3 *S. Typhimurium* (7,5% cada), 2 *S. Kentucky* (5%) e uma de cada de *S. Abony*, *S. Bredeney*, *S. Saintpaul*, e *S. Worthington* (2,5%), além de uma (2,5%) *S. enterica subs. enterica* (rugosa) não tipável, segundo Tabela 1.

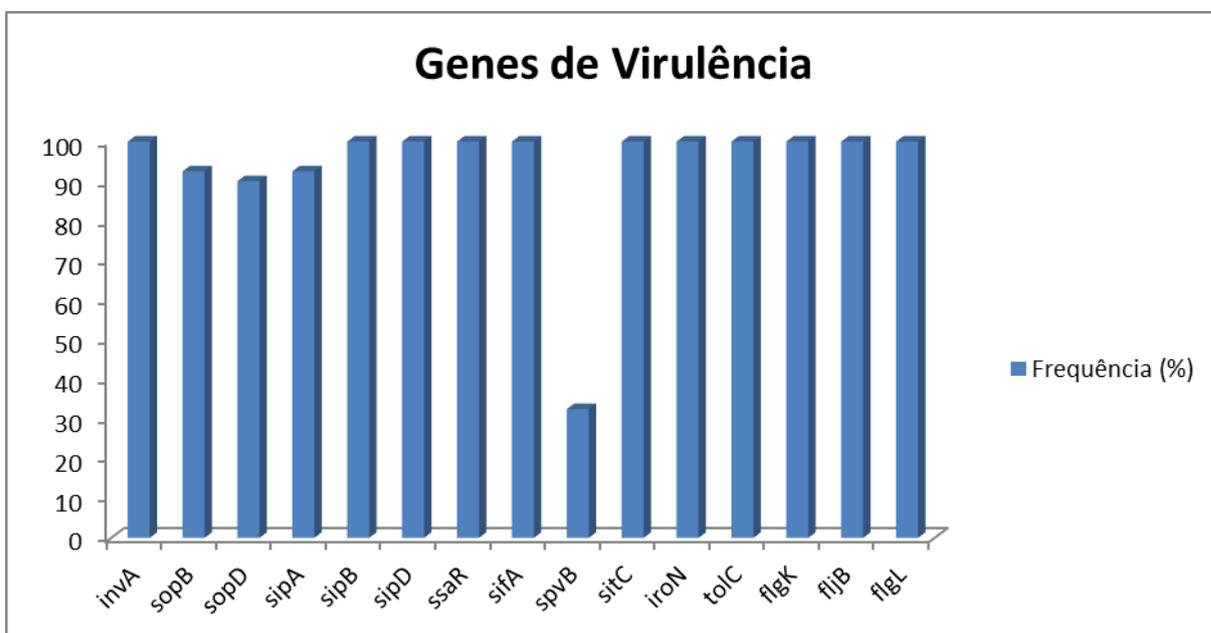
A numeração das cepas relacionadas na Tabela 1 é a mesma da Tabela 2 e das Figuras 12 a 18, com os dendogramas, resultantes da técnica de PFGE.

Tabela 1. Sorovares de *Salmonella* spp. isolados durante as 20 semanas de coleta, a partir das esteiras de lona e poliestireno, de uma planta de abate de aves, no interior do estado de SP.

Nº	Sorovar	Semana/Momento coleta	Material esteira
1	<i>S. Heidelberg</i>	2ª/IV	Poliestireno
5	<i>S. Heidelberg</i>	3ª/IV	Poliestireno
6	<i>S. Heidelberg</i>	4ª/V	Lona
7	<i>S. Heidelberg</i>	4ª/III	Poliestireno
13	<i>S. Heidelberg</i>	8ª/IV	Poliestireno
26	<i>S. Heidelberg</i>	11ª/V	Poliestireno
27	<i>S. Heidelberg</i>	11ª/VI	Poliestireno
30	<i>S. Heidelberg</i>	13ª/V	Poliestireno
32	<i>S. Heidelberg</i>	15ª/IV	Poliestireno
33	<i>S. Heidelberg</i>	15ª/VI	Poliestireno
36	<i>S. Heidelberg</i>	17ª/IV	Poliestireno
8	<i>S. Enteritidis</i>	6ª/II	Poliestireno
9	<i>S. Enteritidis</i>	6ª/III	Poliestireno
10	<i>S. Enteritidis</i>	6ª/V	Poliestireno
15	<i>S. Enteritidis</i>	9ª/I	Lona
18	<i>S. Enteritidis</i>	9ª/VI	Lona
19	<i>S. Enteritidis</i>	9ª/II	Poliestireno
39	<i>S. Enteritidis</i>	19ª/V	Poliestireno
20	<i>S. Ohio</i>	9ª/IV	Poliestireno
16	<i>S. Ohio</i>	9ª/IV	Lona
23	<i>S. Ohio</i>	10ª/V	Poliestireno
24	<i>S. Ohio</i>	10ª/VI	Poliestireno
31	<i>S. Ohio</i>	15ª/IV	Lona
4	<i>S. Mbandaka</i>	3ª/II	Poliestireno
17	<i>S. Mbandaka</i>	9ª/V	Lona
35	<i>S. Mbandaka</i>	17ª/III	Lona
37	<i>S. Mbandaka</i>	17ª/VI	Poliestireno
2	<i>S. Agona</i>	3ª/II	Lona
12	<i>S. Agona</i>	8ª/III	Lona
40	<i>S. Agona</i>	20ª/IV	Poliestireno
11	<i>S. Typhimurium</i>	7ª/III	Poliestireno
29	<i>S. Typhimurium</i>	12ª/VI	Poliestireno
34	<i>S. Typhimurium</i>	16ª/III	Poliestireno
14	<i>S. Kentucky</i>	8ª/VI	Poliestireno
28	<i>S. Kentucky</i>	12ª/V	Poliestireno
21	<i>S. Abony</i>	9ª/VI	Poliestireno
3	<i>S. Bredeney</i>	3ª/IV	Lona
25	<i>S. Saintpaul</i>	11ª/IV	Lona
38	<i>S. Worthington</i>	18ª/V	Poliestireno
22	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (rugosa)	10ª/III	Poliestireno

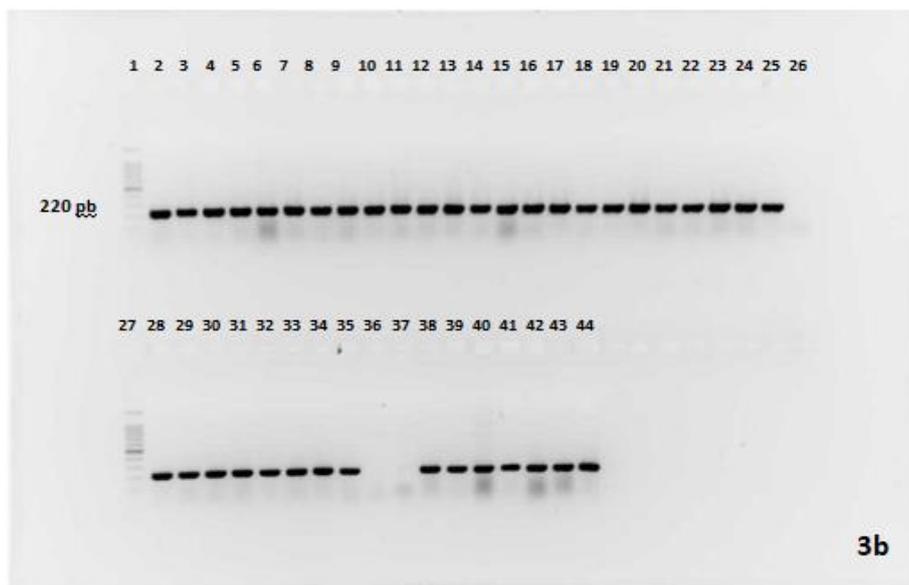
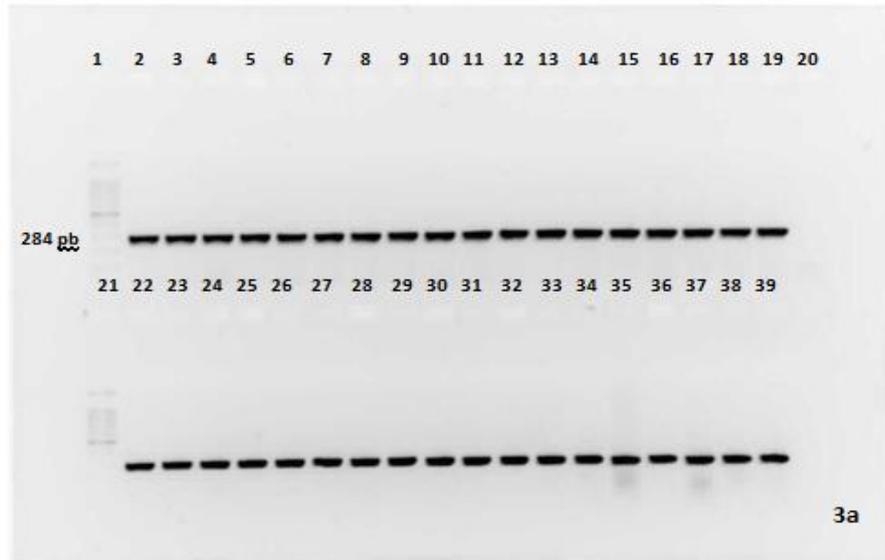
### 4.3. Pesquisa dos genes de virulência em *Salmonella*

Todas as 40 cepas analisadas foram positivas para os genes *invA*, *sipB*, *sipD*, *ssaR*, *sifA*, *sitC*, *tolC*, *flgK*, *fljB* e *flgL*. Os genes *sopB* e *sipA* foram encontrados em 37 cepas (92,5%) e o *sopD*, em 36 (90%). O gene menos frequente foi o *spvB*, presente em apenas 13 isolados (32,5%). Essa distribuição e frequência podem ser melhor observadas na Figura 2.

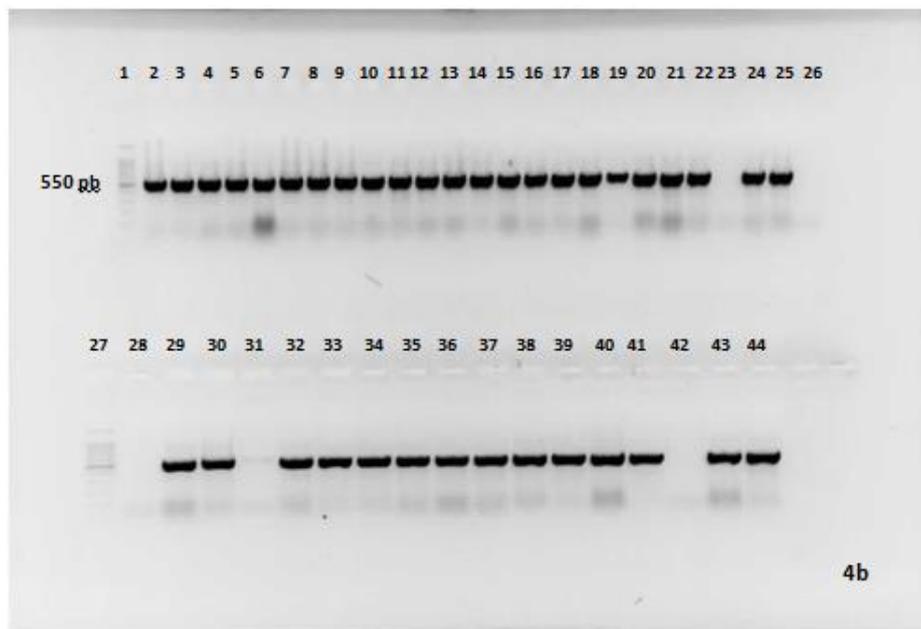
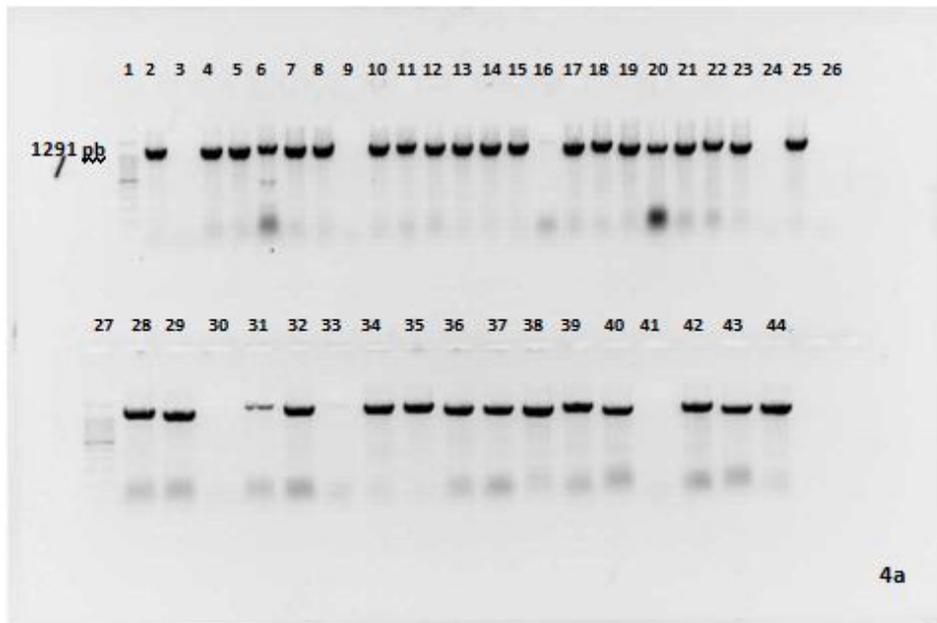


**Figura 2:** Distribuição dos genes de virulência, em cepas de *Salmonella* spp., isoladas de esteiras de um abatedouro de aves.

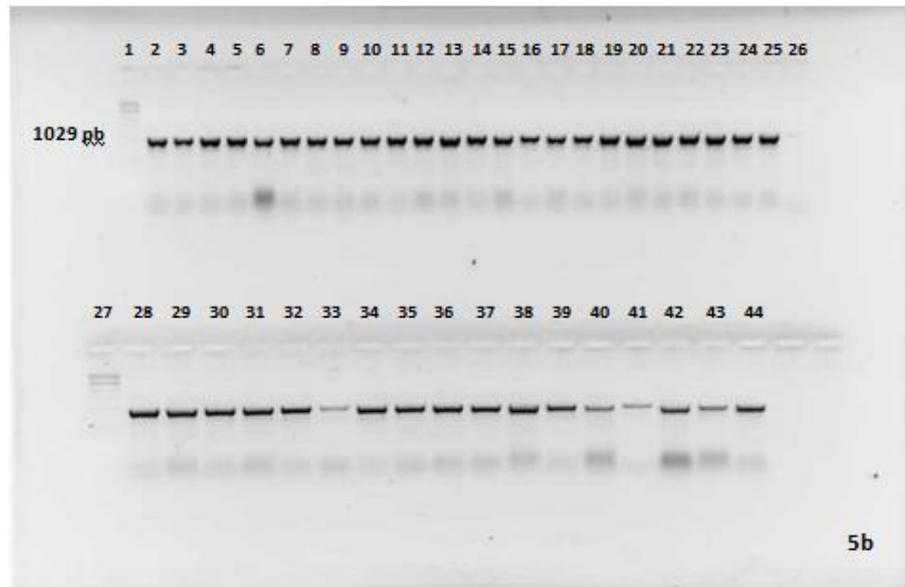
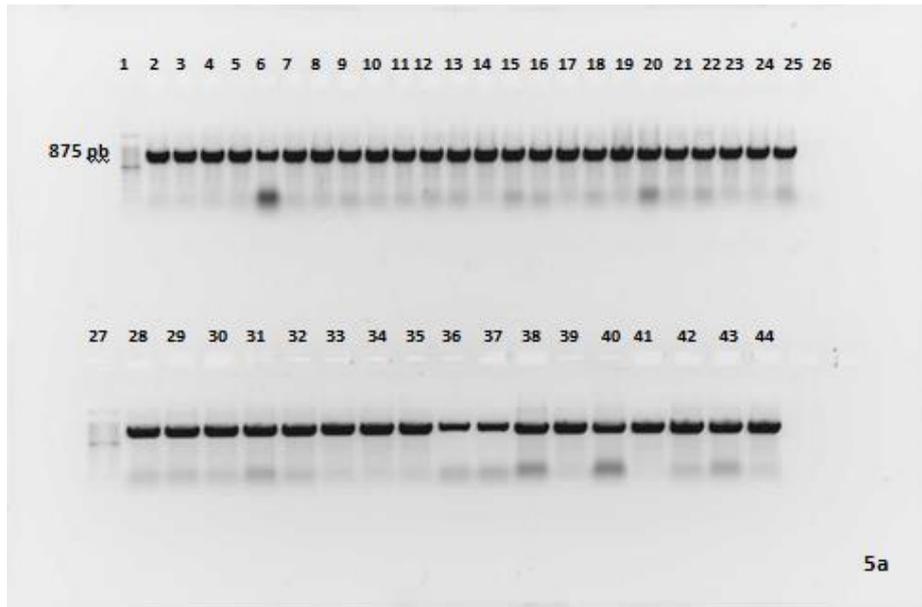
Pelas Figuras 3 a 10, podem-se observar os resultados da PCR, em relação à presença dos genes relacionados à virulência.



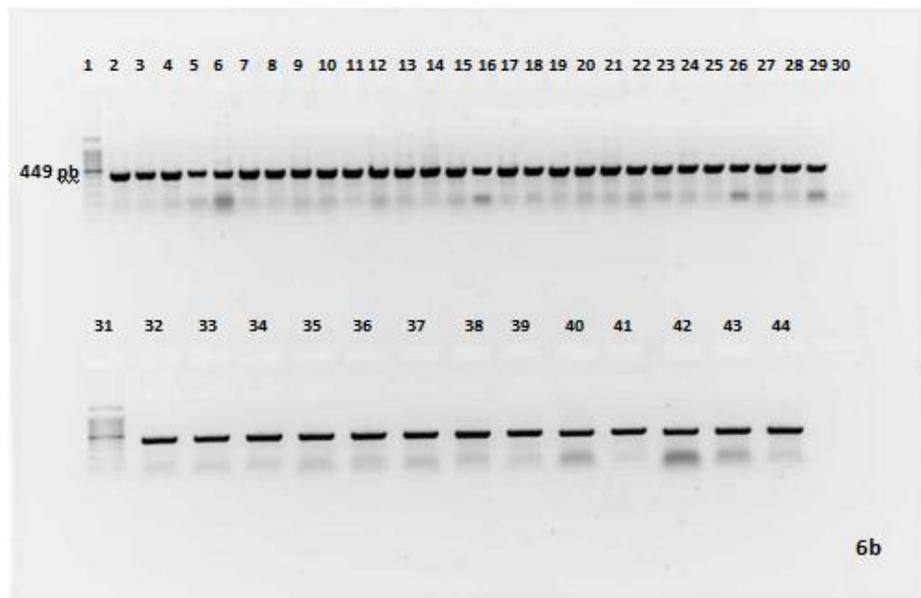
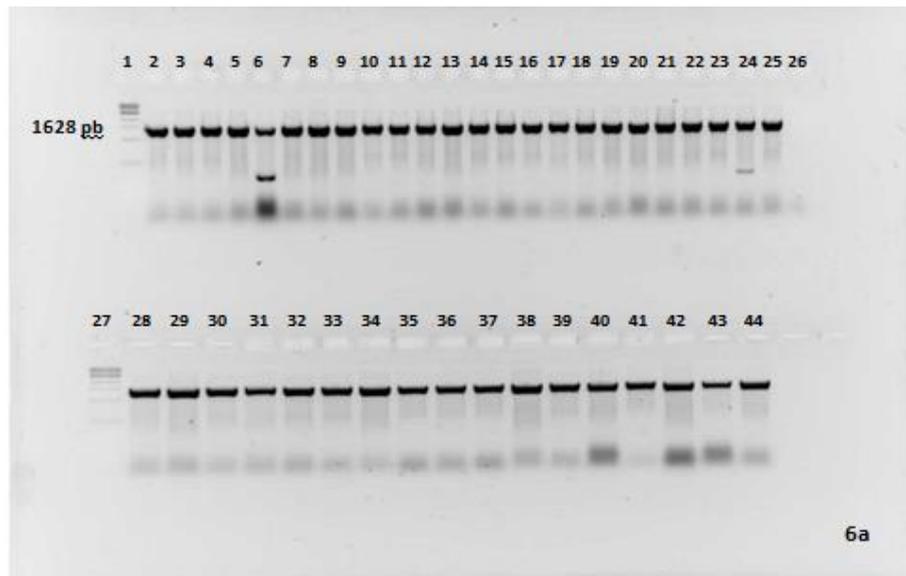
**Figura 3.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *invA* (284 pb). Poços 1 e 21: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-39: amostras; poço 20: controle negativo. (b) gene *sopB* (220 pb). Poço 1: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-43: amostras; poço 44: controle negativo.



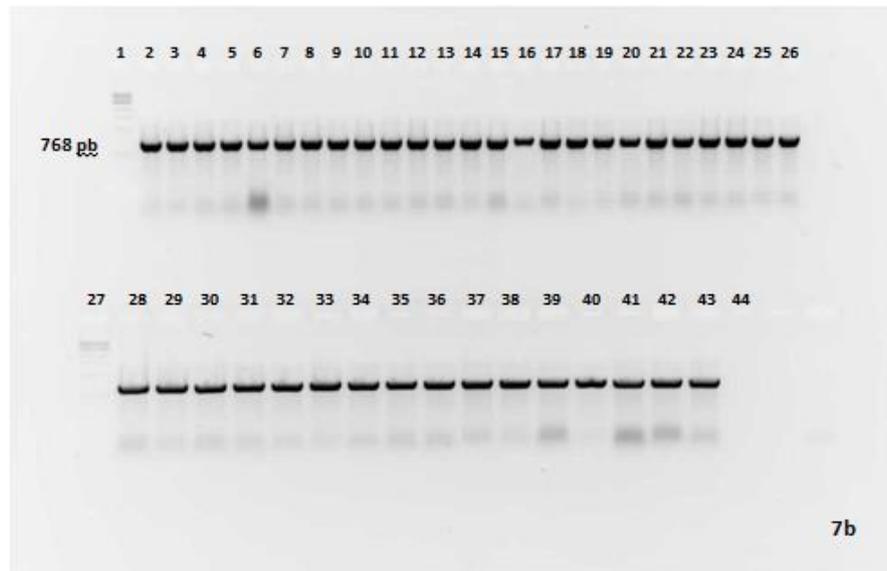
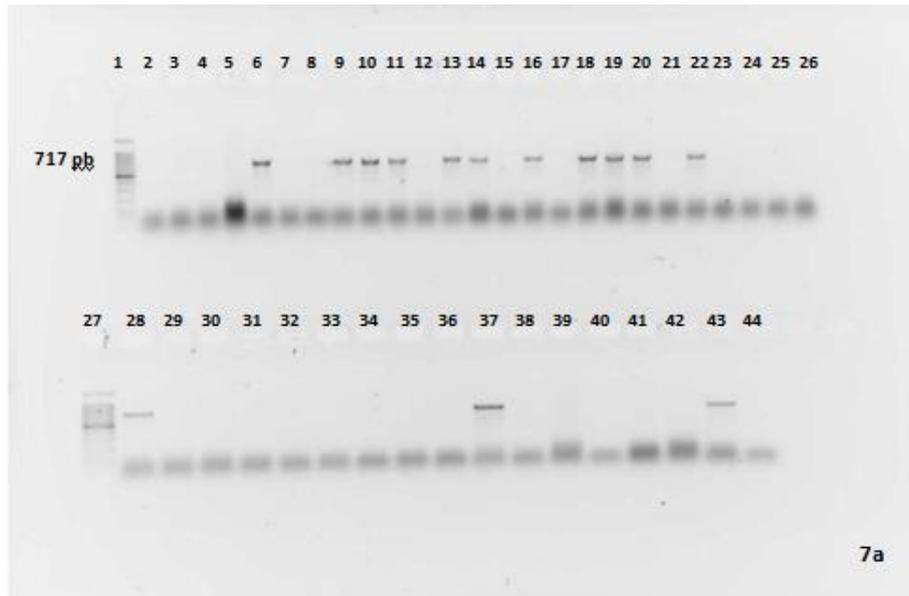
**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *sopD* (1291 pb). Poços 1 e 27: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo. (b) gene *sipA* (550 pb). Poços 1 e 27: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo.



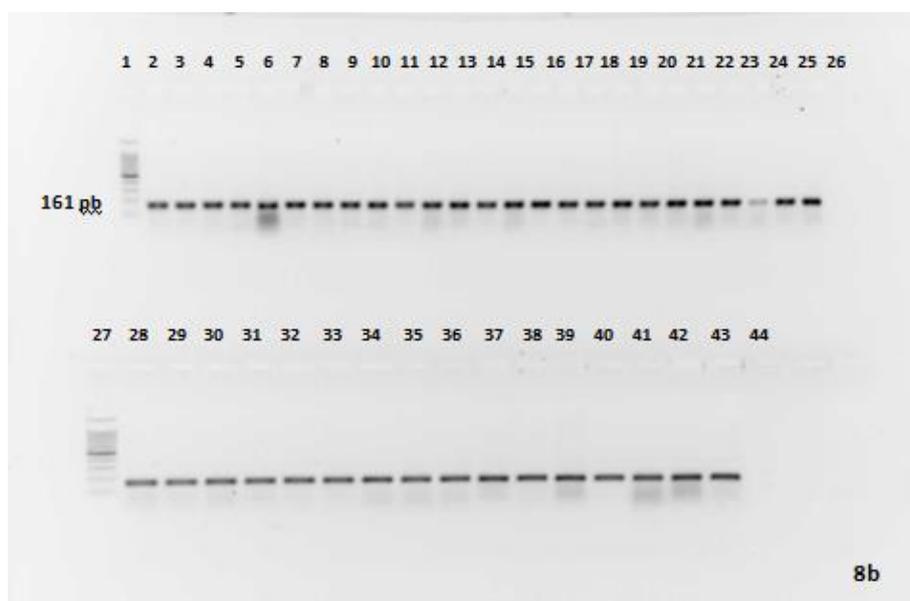
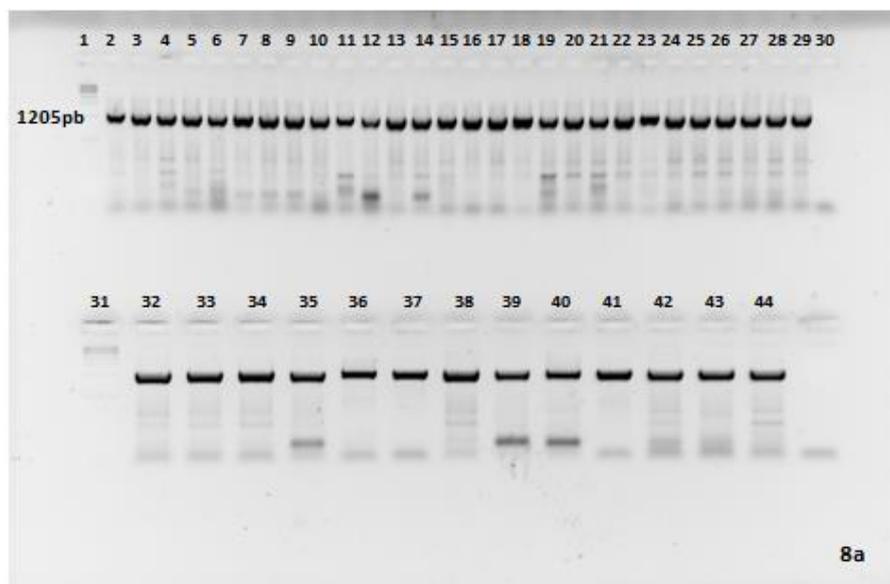
**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *sipB* (875 pb). Poços 1 e 27: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo. (b) gene *sipD* (1029 pb). Poços 1 e 27: 1 kb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo.



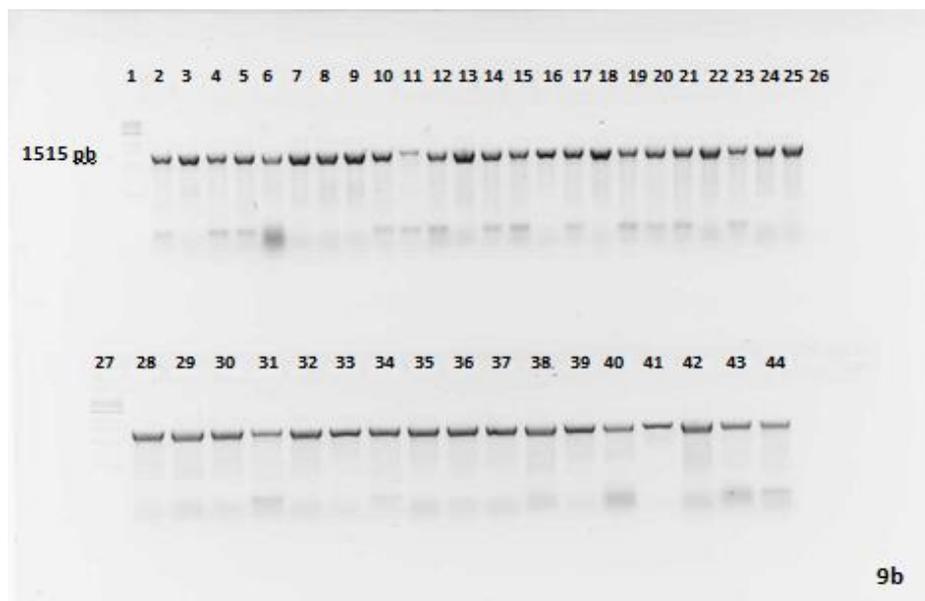
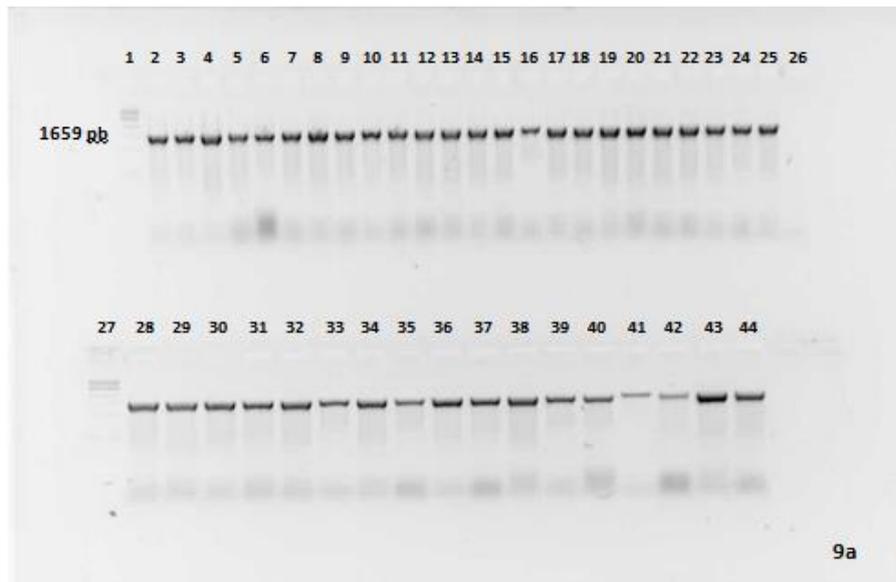
**Figura 6.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *ssaR* (1628 pb). Poços 1 e 27: 1 kb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo. (b) gene *sifA* (449 pb). Poços 1 e 31: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo.



**Figura 7.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *spvB* (717 pb). Poços 1 e 27: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-43: amostras; poço 44: controle negativo. (b) gene *sitC* (768 pb). Poços 1 e 27: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-43: amostras; poço 44: controle negativo.



**Figura 8.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *iroN* (1205 pb). Poços 1 e 31: 1 kb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 30: controle negativo. (b) gene *tolC* (161 pb). Poços 1 e 27: 100 pb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-43: amostras; poço 44: controle negativo.



**Figura 9.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *flgK* (1659 pb). Poços 1 e 27: 1 kb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo. (b) gene *fljB* (1515 pb). Poços 1 e 27: 1 kb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo.



**Figura 10.** Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *flgL* (951 pb). Poços 1 e 27: 1 kb DNA ladder; poço 2: ATCC 14028; poços 3-44: amostras; poço 26: controle negativo.

#### **4.4. Adesão e invasão das cepas de *Salmonella* spp. em células HeLa**

Os valores encontrados para os testes de adesão e invasão, das cepas de *Salmonella* em células HeLa estão apresentados na Tabela 2. Todas as cepas aderiram e invadiram células HeLa, com índice de invasão variando de 1,4 a 73,8%.

#### **4.5. Produção de biofilme em microplaca de poliestireno**

Entre as 40 cepas analisadas, 31 (77,5%) foram consideradas produtoras de biofilme, das quais 15 (37,5%) foram classificadas como fracas produtoras de biofilme, 12 (30%) moderadas e 4 (10%) fortes produtoras.

Tabela 2. Caracterização genotípica e fenotípica de alguns fatores de virulência das 40 cepas de *Salmonella* spp., isoladas de esteiras de um abatedouro de ave.

Cepa	Genótipo															Fenótipo			
	<i>fljB</i>	<i>flgK</i>	<i>flgK</i>	<i>invA</i>	<i>sipA</i>	<i>sipB</i>	<i>sipD</i>	<i>tolC</i>	<i>sopB</i>	<i>sopD</i>	<i>ssaR</i>	<i>sifA</i>	<i>spvB</i>	<i>süC</i>	<i>iroN</i>	Adesão (x10 <sup>6</sup> UFCs)	Invasão (x10 <sup>6</sup> UFCs)	Índice invasão	Produção biofilme
1	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	1,5	0,046	3,1%	+
2	Agona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	1,1	0,62	56,4%	+
3	Bredeney	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	1,7	0,13	7,6%	+
4	Mbandaka	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,36	0,008	2,2%	+
5	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	2,97	0,25	8,4%	+
6	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	1,75	0,12	6,9%	+
7	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	1,8	0,11	6,1%	+
8	Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,7	0,034	4,9%	+
9	Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,24	0,12	50%	+
10	Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,4	0,9	64,3%	+
11	Typhimurium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,82	0,06	7,3%	+
12	Agona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,0	0,09	9%	+
13	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,62	0,6	9,7%	+
14	Kentucky	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,45	0,01	2,2%	+
15	Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,21	0,01	4,8%	+
16	Ohio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,46	0,015	3,3%	+
17	Mbandaka	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,47	0,1	21,3%	+
18	Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,38	0,09	23,7%	+
19	Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1,3	0,24	18,5%	+
20	Ohio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,22	0,01	4,5%	+
21	Abony	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,38	0,02	5,3%	+
22	<i>enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (rugosa)	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	0,4	0,24	60%	+
23	Ohio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,5	0,04	8%	-
24	Ohio	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,78	0,15	19,2%	+
25	Saintpaul	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	0,21	0,06	28,6%	+
26	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	1,01	0,07	6,9%	+
27	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,28	0,05	17,8%	+
28	Kentucky	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,38	0,01	2,6%	-
29	Typhimurium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,35	0,005	1,4%	-
30	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	1,06	0,05	4,7%	-
31	Ohio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,9	0,05	5,5%	-
32	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	0,15	0,013	8,7%	+
33	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	0,72	0,05	6,9%	+
34	Typhimurium	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,42	0,31	73,8%	+
35	Mbandaka	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,9	0,03	3,3%	-
36	Heidelberg	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,6	0,27	45%	-
37	Mbandaka	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	0,49	0,34	69,4%	-
38	Worthington	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,33	0,1	30,3%	-
39	Enteritidis	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	0,59	0,4	67,8%	+
40	Agona	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0,42	0,28	66,7%	+

Legenda: UFC: Unidades Formadoras de Colônias; (%): porcentagem; DO: densidade óptica

#### 4.6. Teste de sensibilidade de disco-difusão

Foram testados 7 antibióticos para definir o padrão de sensibilidade das cepas. Os resultados apresentaram que 13 (32,5%) isolados foram resistentes a, pelo menos, um antibiótico, 5 (12,5%) se enquadraram como intermediárias e 28 (70%) foram sensíveis, conforme Tabela 3.

Tabela 3. Resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos de *Salmonella* spp., isoladas de esteiras de um abatedouro de aves.

Antibiótico	<i>Salmonella</i> spp.(n=40)		
	Sensibilidade N (%)	Intermediário N (%)	Resistência N (%)
Ampicilina	36 (90)	0	4 (10)
Cotrimoxazol	38 (95)	0	2 (5)
Cloranfenicol	35 (87,5)	4 (10)	1(2,5)
Ciprofloxacina	40 (100)	0	0
Cefotaxima	37 (92,2)	0	3 (7,5)
Gentamicina	40 (100)	0	0
Tetraciclina	32 (80)	1 (2,5)	7 (17,5)

#### 4.7. Tipagem molecular por PFGE

A tipagem molecular pela técnica de PFGE foi realizada entre os isolados pertencentes ao mesmo sorovar. Pela Figura 11, observa-se o perfil eletroforético do PFGE, dos 11 isolados de *Salmonella* Heidelberg e após a transferência da imagem para o software Bionumerics (versão 7.6) (Figura 12), pode-se notar 7 perfis de restrição diferentes (H1, H2, H3, H4, H5, H6 e H7) com similaridade variando de 57,6% a 100%, sendo que 4 cepas apresentaram o mesmo perfil (H1), pertencendo a um mesmo clone e que foram isoladas entre a segunda e a 17<sup>a</sup> semana de coleta, demonstrando uma persistência no ambiente de 16 semanas.

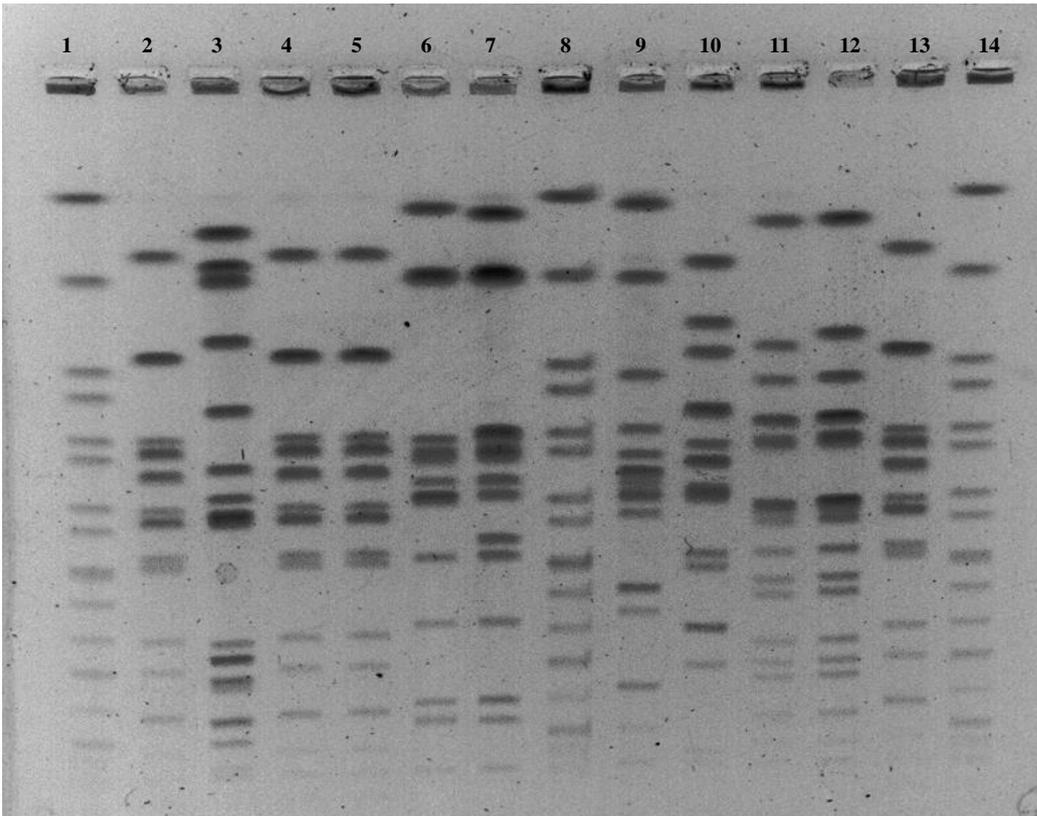


Figura 11. Padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para DNA genômico digerido com XbaI das cepas de *Salmonella* Heidelberg obtidas de esteiras de um abatedouro de aves. Poços 1, 8 e 14: *S. Braenderup* H9812.

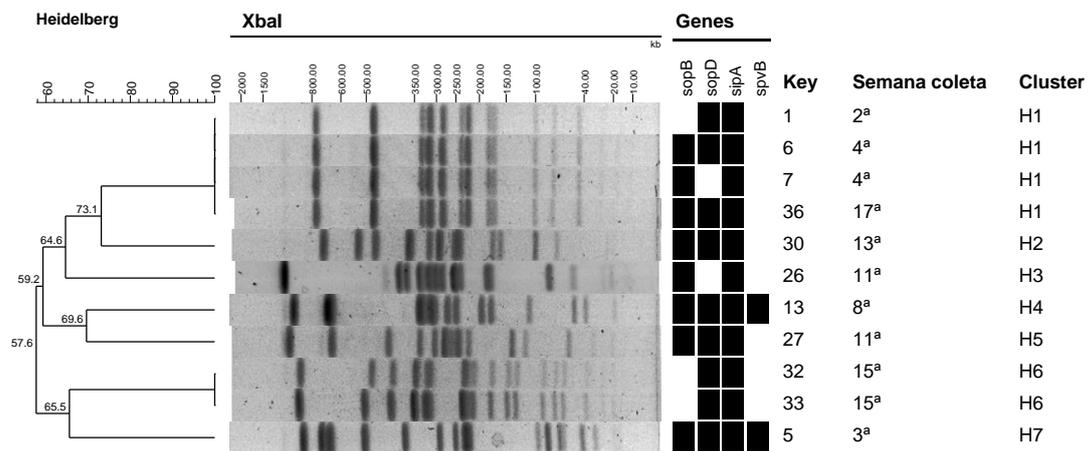


Figura 12. Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Heidelberg obtidas de esteiras de um abatedouro de aves. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a 1,5%. (Os quadrados pretos indicam a presença do gene e os brancos, a ausência. Cluster = nomenclatura do padrão).

Entre as 7 cepas pertencentes ao sorovar *S. Enteritidis* (Figura 13), foi possível observar a existência de 4 perfis de restrição (E1, E2, E3 e E4) os quais compartilhavam

89,2% de similaridade. O cluster em que os isolados apresentaram 100% de similaridade entre si revelou a persistência no ambiente de cepas coletadas entre a 6ª e 19ª semana. É interessante notar que, apesar de terem sido detectados 4 clones diferentes, o perfil genético entre os genes pesquisados é muito semelhante.

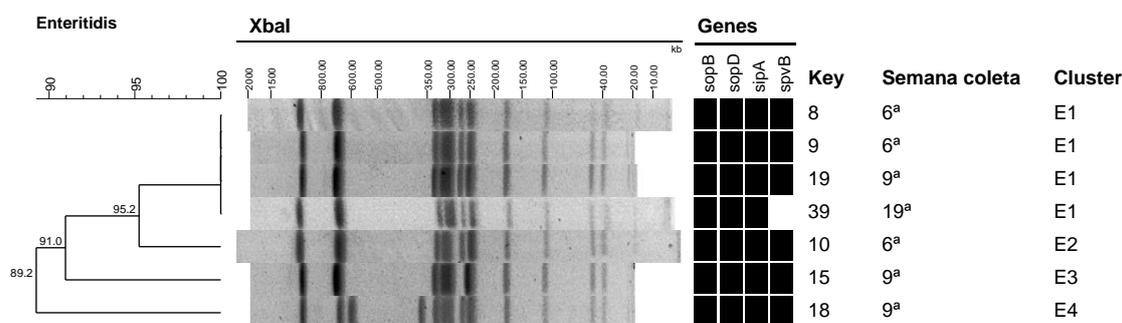


Figura 13. Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Enteritidis obtidas de esteiras de um abatedouro de aves. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a 1,5%. (Os quadrados pretos indicam a presença do gene e os brancos, a ausência. Cluster = nomenclatura do padrão).

Com relação ao sorovar *S. Ohio* (Figura 14) todas as 5 cepas avaliadas foram classificadas com o mesmo perfil (O1), já os 4 isolados de *S. Mbandaka* (Figura 15) geraram 4 perfis de restrição (M1, M2, M3 e M4) sem nenhum clone relacionado entre si, pois tiveram somente 47,4% de similaridade, assim como os 3 isolados do sorovar *S. Typhimurium* (Figura 16) que apresentaram 3 perfis (T1, T2 e T3), os quais compartilhavam 65,5% de similaridade.

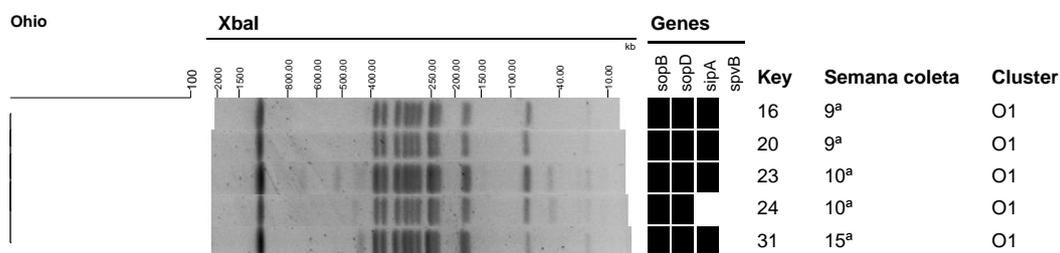


Figura 14. Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Ohio obtidas de esteiras de um abatedouro de aves. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a 1,5%. (Os quadrados pretos indicam a presença do gene e os brancos, a ausência. Cluster = nomenclatura do padrão).

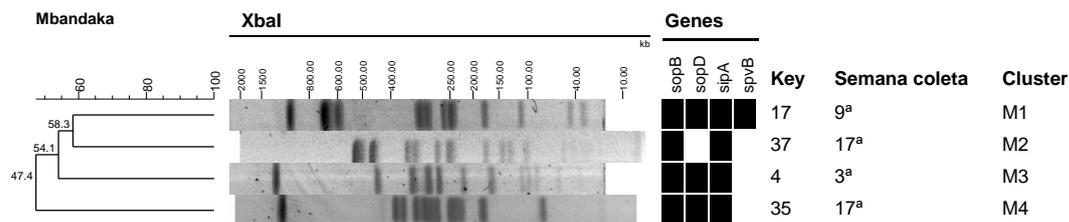


Figura 15. Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Mbandaka obtidas de esteiras de um abatedouro de aves. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a 1,5%. (Os quadrados pretos indicam a presença do gene e os brancos, a ausência. Cluster = nomenclatura do padrão).

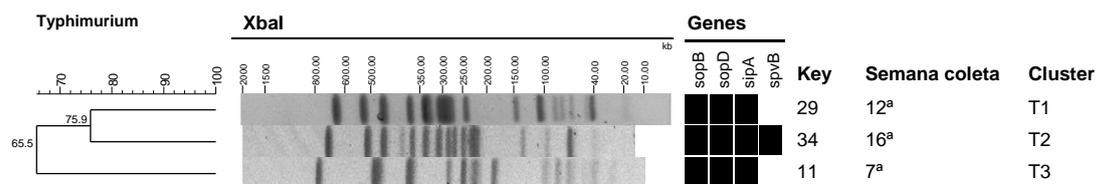


Figura 16. Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Typhimurium obtidas de esteiras de um abatedouro de aves. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a 1,5%. (Os quadrados pretos indicam a presença do gene e os brancos, a ausência. Cluster = nomenclatura do padrão).

Nas 3 cepas de *S. Agona* (Figura 17) pode-se observar a existência de 2 diferentes perfis (A1 e A2), sendo 2 cepas com o perfil A1 e uma com o perfil A2, compartilhando 81,0% de similaridade. Adotando-se um índice de similaridade de 80%, segundo Kitchel et al. (2009), podemos observar que os isolados obtidos na terceira e vigésima semanas fazem parte do mesmo clone, demonstrando a presença dessa bactéria no ambiente por 18 semanas. Por fim, as 2 cepas avaliadas de *S. Kentucky* (Figura 18) geraram 2 perfis (K1 e K2) com 96,6% de similaridade.

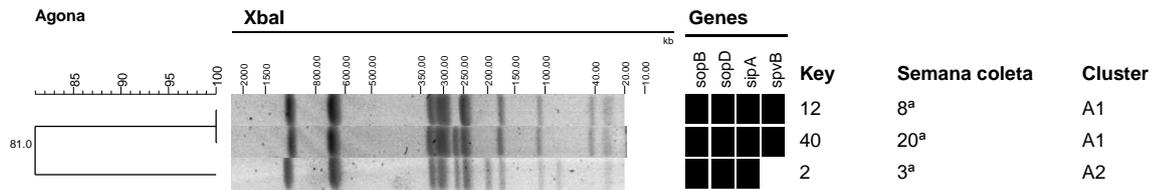


Figura 17. Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Agona obtidas de esteiras de um abatedouro de aves. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a 1,5%. (Os quadrados pretos indicam a presença do gene e os brancos, a ausência. Cluster = nomenclatura do padrão).

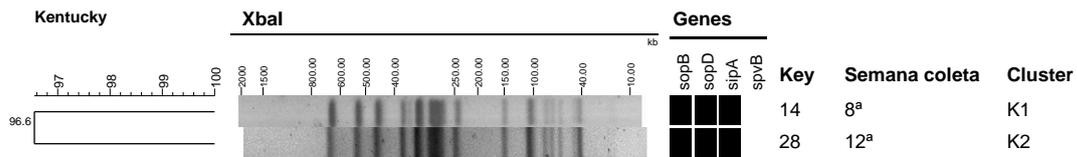


Figura 18. Dendrograma dos padrões de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* Kentucky obtidas de esteiras de um abatedouro de aves. Método de clusterização UPGMA, similaridade baseada no coeficiente de Dice (%). Tolerância e otimização definidas a 1,5%. (Os quadrados pretos indicam a presença do gene e os brancos, a ausência. Cluster = nomenclatura do padrão).

## 5. DISCUSSÃO

As aves de capoeira são consideradas reservatórios de *Salmonella* spp. e seus produtos são tidos como a principal fonte de infecção humana, pelo manuseio e consumo de carnes e ovos contaminados. Quando uma ave é exposta à *Salmonella*, todo o rebanho pode ser rapidamente colonizado. A maioria dos animais adultos colonizados são portadores, o que facilita a disseminação dessa bactéria na cadeia alimentar e sua eventual transmissão para os seres humanos (Tozzo et al., 2018). Um total de 40 isolados foi obtido durante as 20 semanas de coletas, a partir de dois tipos de esteira, numa planta de abate de aves, sendo *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Ohio* os sorovares mais prevalentes. A gastroenterite humana é causada por diferentes sorovares de *S. enterica*, sendo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, os sorovares mais comumente envolvidos (Litrup et al., 2010; Kawasaki, 2012; LaRock et al., 2015). Em 2013, nos Estados Unidos, *Salmonella* spp. foi responsável por 26% dos surtos de doenças causadas por alimentos contaminados por bactérias, sendo *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Newport* e *S. Javiana* os principais sorovares (CDC, 2013).

Atualmente, observa-se uma inversão nessa prevalência. Por anos, *S. Enteritidis* ganhou destaque como principal agente causador de gastroenterites, porém com a implementação de medidas de controle e vacinação, sua frequência tem diminuído substancialmente e, em contrapartida, tem aumentado a frequência de sorovares anteriormente não tão comuns e multirresistentes a antimicrobianos como *S. Heidelberg* e *S. Kentucky* (Foley et al., 2011; Campos et al., 2017). Essa tendência foi observada também a partir dos resultados do presente estudo, que teve *S. Heidelberg* como sorovar predominante.

*S. Heidelberg* é um dos sorovares mais comumente isolados de aves de capoeira e encontra-se entre os cinco sorovares mais importantes associados à salmonelose humana (Foley et al., 2011). Esse sorovar tem sido relatado como uma das causas mais comuns de salmonelose nos Estados Unidos e no Canadá, embora seja citado com menor frequência na América do Sul e na Europa. Foi possível perceber um aumento da resistência às cefalosporinas de espectro estendido em isolados humanos e agro-alimentares desse sorovar em países da América do Norte. Este perfil de resistência está associado principalmente à disseminação do plasmídeo *bla<sub>CMY-2</sub>*, que codifica a enzima AmpC β-lactamase (Cejas et al., 2014).

Nas últimas décadas, tem sido relado um aumento da incidência de resistência antimicrobiana em cepas transmitidas por alimentos. A resistência a múltiplos agentes antimicrobianos tornou-se uma preocupação crescente, pois limita as opções de tratamento para doenças invasivas, além de favorecer a transferência de fatores de resistência para outros micro-organismos patogênicos (Iglesias et al., 2017; Kao et al., 2017). O uso indiscriminado de antibióticos tanto em humanos como na área veterinária propiciou o surgimento de cepas de *Salmonella* resistentes aos antibióticos de uso comum, como a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas, trimetoprim e tetraciclina (Singh e Mustapha, 2013), bem como o aumento da resistência às cefalosporinas de espectro expandido e às quinolonas, fármacos mais comumente usados no tratamento da salmonelose (Kao et al., 2017).

Embora os casos de salmonelose humana sejam auto-limitantes e não necessitem do uso de antibacterianos, a terapia com antibióticos pode ser aplicada em casos mais graves, como em doenças extra-intestinais ou em pacientes imunocomprometidos. Neste contexto, os sorovares de *Salmonella* multirresistentes são considerados motivo de preocupação já que podem comprometer o tratamento efetivo da doença, com o agravamento do quadro, prorrogando o período de hospitalização ou levando à morte (Singh e Mustapha, 2013; Procura et al., 2017).

Pela Tabela 3, observa-se resistência à tetraciclina (17,5%), ampicilina (10%), cefotaxima (7,5%), cotrimoxazol (5%) e cloranfenicol (2,5%) dos sorovares de *Salmonella*, além de 4 isolados com resistência intermediária ao cloranfenicol e apenas um isolado à tetraciclina. Todos os sorovares foram sensíveis a ciprofloxacina e a gentamicina. Favier et al. (2013) ao analisarem a prevalência de *Salmonella* spp. em alimentos de origem animal vendidos no varejo, na Argentina, encontraram sorovares resistentes à ampicilina e tetraciclina e, em contrapartida, todos os isolados foram sensíveis à ciprofloxacina, cloranfenicol, cotrimoxazol, gentamicina e cefotaxima. Iglesias et al. (2017), ao abordarem a ocorrência de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em carcaças de bovinos nos abatedouros no sul do Brasil, encontraram sorovares de *Salmonella* resistentes à ampicilina, cefoxitina, cefalotina, cotrimoxazol, estreptomicina e tetraciclina.

Vários autores observaram diferentes perfis de susceptibilidade antimicrobiana dependendo dos sorovares de *Salmonella* estudados (Clemente et al., 2014; Mağa et al., 2014; El-Tayeb et al., 2017; Kao et al., 2017; Zhu et al.; 2017). No presente trabalho, 54,5% dos sorovares de *S. Heidelberg* foram resistentes a, pelo menos, um dos

antibióticos testados, além de susceptibilidade reduzida à cefotaxima, cloranfenicol e tetraciclina em alguns sorovares como *S. Agona*, *S. Albony*, *S. Bredeney*, *S. Enteritidis*, *S. Mbandaka* e *S. Saintpaul*.

Os resultados apresentados fornecem dados úteis sobre a susceptibilidade antimicrobiana dos diferentes sorovares de *Salmonella* e destacam a alta diversidade de multirresistência aos antibióticos em questão. Este é um importante aspecto relacionado às doenças transmitidas por alimentos que, somada aos diferentes fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade das bactérias, dificultam o controle dessas doenças (Iglesias et al., 2017).

Os genes de virulência, *invA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *spvB*, *ssaR*, *sifA*, *tolC*, *flgK*, *fljB* e *flgL* investigados nesse estudo codificam proteínas ligadas ao processo de adesão, invasão, sobrevivência e replicação no interior das células, além dos genes *sitC* e *iroN* que estão envolvidos na aquisição de ferro. Dos 15 genes testados, 11 foram encontrados em todos sorovares analisados, demonstrando o alto potencial patogênico dessas cepas. Os genes *sipA* e *sopB* estavam ausentes em 3 isolados enquanto *spvB* esteve presente em menor frequência quando comparado aos demais.

Campioni et al. (2012), ao analisarem 128 isolados de *S. Enteritidis*, verificaram que 97,6% deles abrigavam todos os genes de virulência investigados (*invA*, *sipA*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *ssaR*, *sifA*, *spvB*, *prot6E*, *flgK*, *fljB* e *flgL*), sendo que apenas uma cepa foi negativa para o gene *sipA*. Resultados similares foram obtidos por Almeida et al. (2013) que, ao estudarem 35 isolados de *S. Infantis* isoladas de fezes humanas e itens alimentares de casos esporádicos ocorridos na cidade de São Paulo, constataram que todas as cepas carregavam os genes *flgK*, *fljB*, *flgL*, *invA*, *sopB* e *sifA*. Apenas 2 isolados foram negativos para os genes *sipA* e *sipD* e 2 para o gene *ssaR*. Nenhuma das cepas em questão apresentaram o gene *spvB*. Mezal et al. (2013) detectaram 100% de positividade para 11 dos 17 genes de virulência testados em uma amostra de 50 isolados de *S. Javiana* obtidas de amostras ambientais, alimentares e clínicas. O gene *spvB* não foi encontrado em nenhuma das cepas. Mezal et al. (2014) estudaram 60 cepas de *S. Enteritidis*, isoladas de aves domésticas e de amostras clínicas, e todas foram positivas para 12 ou mais dos 17 genes de virulência (*spvB*, *spiA*, *pagC*, *msgA*, *invA*, *sipB*, *prgH*, *spaN*, *orgA*, *tolC*, *iroN*, *sitC*, *IpfC*, *sifA*, *sopB*, *pefA* e *cdtB*).

Esses resultados sugerem não haver nenhuma diferença na presença dos genes de virulência nos isolados clínicos, ambientais ou de origem alimentar, mostrando o grande potencial desses isolados em causar infecções humanas.

Para os micro-organismos patogênicos colonizarem e se estabelecerem em organismos multicelulares frequentemente associam-se às células eucarióticas do hospedeiro para não competirem com as bactérias comensais e/ou para driblarem o sistema imunológico do hospedeiro (Hauck et al., 2006).

No presente estudo, todas as cepas foram capazes de aderir em células HeLa, com valores de recuperação celular variando de  $0,2 \times 10^6$  a  $3,0 \times 10^6$  UFC e *S. Heidelberg* foi o sorovar que apresentou os maiores valores de adesão. Os valores de recuperação no teste de invasão variaram de  $0,005 \times 10^6$  a  $0,9 \times 10^6$  UFC, resultando em índices de invasão que variaram de 1,4 a 73,8%. Avaliando-se os índices de invasão de cada sorovar, observou-se também uma variação dessa taxa entre isolados do mesmo sorovar. Shah et al. (2011), ao testarem 53 isolados de *S. Enteritidis* provenientes de aves de capoeira, constataram que todos os isolados foram capazes de invadir células epiteliais intestinais (Caco-2) em diferentes intensidades, sem correlação entre os índices de invasão e a presença do gene *spvB* associado à virulência em *Salmonella*, fato também observado no presente trabalho. Esses mesmos autores, ao caracterizarem os isolados que apresentaram uma baixa capacidade de invasão, observaram um comprometimento da mobilidade e da secreção de proteínas associadas ao flagelo (FlgK, FljB e FlgL) ou do T3SS, secretando as proteínas SipA e SipD, codificado pela SPI-1.

Moreira et al. (2012) demonstraram que a interação entre os sensores de histidina quinase QseC e QseE desempenha um importante papel na infecção de *S. Typhimurium* ao realizarem testes de adesão e invasão em células HeLa. Esses sensores atuam na transcrição dos genes na SPI-1 e SPI-2 durante a patogênese, aumentando ou diminuindo a capacidade de invasão dessa bactéria, mostrando que a presença dos genes de virulência não é o único fator determinante para o estabelecimento da infecção. Razzuoli et al. (2017) demonstraram que sistema imune inato do hospedeiro desencadeia uma resposta inflamatória pela presença da *Salmonella*, auxiliando a sua competição contra a microbiota intestinal. Ao investigarem a capacidade de diferentes sorovares de *Salmonella* (*S. Ablogame*, *S. Thompson*, *S. Coeln*, *S. Veneziana* e *S. Diarizonae*) em invadir células IPEC-J2 (linhagem celular estabelecida obtida do jejuno de um leitão com menos de 12 horas de idade) e modular a imunidade intestinal inata, constataram que os isolados que apresentaram maior capacidade em invadir essas células foram capazes de regular a expressão de genes de interleucina 8 (IL-8) e do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ). Em contrapartida, ocorreu uma forte correlação entre invasividade reduzida e falha na estimulação de genes de citocinas inflamatórias.

Os biofilmes podem proteger as bactérias de antimicrobianos e de ataques do sistema imune. No ambiente, protegem as bactérias tornando-as menos sensíveis aos sanitizantes quando comparados às células planctônicas, dificultando a sua eliminação mesmo em condições ambientais desfavoráveis, como matadouros de animais e plantas de processamento (Wang et al., 2013; Zhao et al., 2017; Zadernowska e Chajęcka-Wierzchowska, 2017).

Na avaliação da capacidade de produção de biofilme em microplaca de poliestireno, observou-se que 31 (77, 5%) das cepas de *Salmonella* foram capazes de produzir biofilme, sendo 37,5% classificadas como fracas produtoras, 30% como moderadas e 10% fortes produtoras de biofilme.

Um estudo conduzido por Nair et al. (2015) revelou que 85% das 40 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos, do ambiente e de amostras clínicas formaram biofilme em microplacas de poliestireno. Valores similares foram encontrados por Zadernowska e Chajęcka-Wierzchowska (2017) ao verificarem que 87,5% dos 16 isolados de *Salmonella* spp. foram classificadas como produtores de biofilme. Em ambos os estudos não foi encontrada nenhuma cepa classificada como forte produtora de biofilme, em contrapartida nesse trabalho 4 cepas se enquadraram nessa classificação. *Salmonella* é conhecida pela sua habilidade em produzir biofilme em diferentes superfícies, fato que contribui para sua sobrevivência em ambientes hostis e favorece sua transmissão para novos hospedeiros e superfícies.

A tipagem molecular de *Salmonella*, entre e dentro do mesmo sorovar, é imprescindível para rastrear potenciais fontes infecciosas propiciando um controle epidemiológico mais efetivo (Nair et al., 2015). O PFGE é tido como padrão ouro na avaliação da relação entre os isolados de *Salmonella* de fontes distintas, pois esse método permite a detecção de polimorfismos no DNA e o estabelecimento da relação genética de diferentes cepas bacterianas (Santos et al., 2007; Barco et al., 2013; Mezal et al., 2014).

O PFGE de DNA genômico digerido com XbaI de 11 cepas de *S. Heidelberg*, 7 *S. Enteritidis*, 5 de *S. Ohio*, 3 de *S. Agona* e 2 *S. Kentucky* permitiu, por meio da análise do dendograma, a identificação de grupos ou clusters com mais de 80% similaridade entre as cepas pertencentes a eles (Kitchel et al., 2009), revelando a persistência desses clones no ambiente, já que foram obtidos em diferentes semanas de coleta e provenientes dos dois tipos de esteiras (lona e poliestireno). A persistência desses clones no ambiente pode estar associada à produção de biofilme, uma vez que algumas dessas

cepas foram classificadas como produtoras de biofilmes ou mesmo pela associação delas em biofilmes de outros micro-organismos, demonstrando possíveis falhas na higienização, elevando o risco de contaminação das carcaças e comprometendo toda a linha de produção. Considerando-se 80% de similaridade (Kitchel et al., 2009), o mesmo clone de *S. Agona* permaneceu no ambiente por 18 semanas e todas as três cepas desse clone eram produtoras de biofilme. Por outro lado, os quatro isolados de *S. Mbandaka* (Figura 15) representam 4 perfis clonais diferentes e dois deles (50%) não produziam biofilme.

Mezal et al. (2013) analisaram os perfis de PFGE de 50 isolados de *S. Javiana* obtidos de alimentos, amostras ambientais e clínicas e identificaram 5 grupos de duas ou mais cepas com limite de similaridade de 90%. A semelhança nos perfis de PFGE entre alguns isolados de amostras alimentares, ambientais e clínicas revelou o potencial desses alimentos e do meio ambiente como fonte de infecção humana.

Fardsanei et al. (2017) compararam por PFGE a diversidade genética de 34 cepas de *S. Enteritidis*, isoladas de carnes (de aves capoeiras, cordeiro, boi) e ovos e identificaram 4 principais grupos (A, B, C e D) e 6 padrões distintos. O grupo A continha cepas de carne de frango e cordeiro, os grupos B e C foram compostos somente por cepas de carne de frango e o grupo D foi formado por isolados de diferentes fontes alimentares, incluindo todas as amostras provenientes dos ovos. Esses autores observaram padrões indistinguíveis entre a maioria das cepas de *S. Enteritidis*, além de constataram que, em alguns casos, não houve associação entre os perfis de virulência ou de susceptibilidade aos antibacterianos e os clusters determinados pelo PFGE, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo. Em contrapartida, Li et al. (2017), ao realizarem a tipagem de 138 isolados de *S. Typhimurium* recuperados a partir de carne de frango crua em 7 províncias da China, encontraram 66 padrões de PFGE e 12 clusters e observaram que os isolados com perfis semelhantes de PFGE no mesmo cluster eram todos resistentes a categorias e números similares de antibióticos e continham semelhantes genes de resistência.

## 6. CONCLUSÃO

Todos os isolados de *Salmonella* foram capazes de aderir e invadir células HeLa, porém não foi possível estabelecer uma relação direta entre a baixa/alta taxa de adesão e invasão com a ausência/presença dos genes que codificam proteínas efetoras envolvidas nesses processos, indicando a possível presença de outros genes ou mecanismos.

Clones de *Salmonella* Heidelberg, *S. Enteritidis*, *S. Ohio*, *S. Agona* e *S. Kentucky* foram detectados por até 18 semanas, demonstrando a persistência e propagação desses patógenos nas superfícies de contato da planta de processamento, ocasionando contaminação cruzada com carcaças de boa qualidade. Essa permanência se deve, principalmente, pela produção de biofilme pela maioria das cepas. A contaminação desses alimentos se torna mais problemática, uma vez que os isolados apresentaram capacidade de invasão celular e resistência a vários antimicrobianos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF. A Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos. Relatório Anual, 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>. Acessado em: 15 de julho de 2017.

ALALI, W.Q., et al. Prevalence of *Salmonella* on retail chicken meat in Russian Federation. **Journal of Food Protection**, v.75, n.8, p.1469-1473, 2012.

ALMEIDA, F., et al. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v.19, p.145-151, 2013.

ALVA-MURILLO, N.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-MEZA, J. E. Short chain fatty acids (propionic and hexanoic) decrease *Staphylococcus aureus* internalization into bovine mammary epithelial cells and modulate antimicrobial peptide expression. **Veterinary Microbiology**, v. 55, n. 2–4, p. 324–331, 2011.

ANDREATTI FILHO, R.L., et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.4, n.3, p. 90-101, 2001.

ANDREATTI FILHO, R.L., et al. Comparação de métodos para extração de DNA na reação em cadeia da polimerase para detecção de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em produtos avícolas. **Ciência Animal Brasileira, Goiânia**, v.12, n.1, p.115-119, 2011.

ANTUNES, P., et al. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v.22, p.110-121, 2016.

ARNOLD, T., et al. Impact of *invA*-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of salmonella in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. **Journal of Veterinary Medicine series B**, v. 51, n. 10, p. 459-463, 2004.

BARCO, L., et al. *Salmonella* source attribution based on microbial subtyping. **International Journal of Food Microbiology**, v.163, p. 193-203, 2013.

BARRET, T.J.; GERNER-SMIDT, P.; SWAMINATHAN, B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.3, n.1, p. 20-31, 2006.

BARROW, P.A.; FREITAS NETO, O.C. Pullorum disease and fowl typhoid – new thoughts on old diseases: a review. **Avian Pathology**, v.40, n.1, p.1-13, 2011.

BATISTA, D.F.A., et al. Identification and characterization of regions of difference between the *Salmonella* Gallinarum biovar Gallinarum and the *Salmonella* Gallinarum biovar Pullorum genomes. **Infection, Genetics and Evolution**, v.30, p.74-81, 2015.

BAUER, A.W., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, n.4, p.493-466, 1966.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *Salmonella*: a practical approach to the organism and its control in foods. Iowa: **Blackwell Science**, 2002.

BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul (2006)**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

BIERSCHENK, D.; BOUCHER, D.; SCHRODER, K. *Salmonella*-induced inflammasome activation in humans. **Molecular Immunology**, v.86, p.38-43, 2017.

BOLLAERTS, K., et al. Human salmonellosis: estimation of dose-illness from outbreak data. **Risk Analysis**, v.28, n.2, p. 427-440, 2008.

BOLTON, D.J.; IVORY, C.; MCDOWELL, D. A study of *Salmonella* in pigs from birth to carcass: serotypes, genotypes, antibiotic resistance and virulence profiles. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 298–303, 2013.

BOPP, D.J., et al. A. Implementation of *Salmonella* serotype determination using pulsed-field gel electrophoresis in a state public health laboratory. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 85, n. 4, p. 416-418, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/maio/29/Apresentacao-Surtos-DTA-2017.pdf>. Acessado em: 29 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2001.

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

CAMPOS, L.C. Microbiologia. São Paulo, **Atheneu**, 2005.

CAMPOS, J., et al. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *S. Minnesota* in European Union, 2014-2015. **International Journal of Antimicrobial Agents**, <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.09.006>., 2017.

CARDOSO, A.L.S.P., et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, v.24, p.1-12, 2015.

CARVALHO, A.C.F.B; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p. 1465-1468, 2005.

CDC, 2011. National Enteric Disease Surveillance: *Salmonella* Annual Report, 2011. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncezid/dfwed/pdfs/salmonella-annual-report-2011-508c.pdf>. Acessado em: 29 de junho de 2017.

CDC, 2013. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report. Centers for Disease Control and Prevention, USA. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf>. Acessado em: 30 de agosto de 2017.

CEJAS, D., et al. First detection of CMY-2 plasmid mediated  $\beta$ -lactamase in *Salmonella* Heidelberg in South America. **Revista Argentina de Microbiología**, v.46, n.1, p.30-33, 2014.

CHAKROUN, I., et al. Adhesion, invasion, cytotoxic effect and cytokine production in response to atypical *Salmonella* Typhimurium infection. **Microbial Pathogenesis**, v.106, p.40-49, 2017.

CHAKROUN, I., et al. Motility, biofilm formation, apoptotic effect and virulence gene expression of atypical *Salmonella* Typhimurium outside and inside Caco-2 cells. **Microbial Pathogenesis**, v.114, p.153-162, 2018.

CLEMENTE, L., et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* isolates from healthy breeder and broiler flocks in Portugal. **The Veterinary Journal**, v.200, p.276-281, 2014.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2012.

COBURN, B.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. Salmonella, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v.85, p.112-118, 2007.

COLLIGHAN, R.J.; WOODWARD, M.J. The SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is encoded within a pathogenicity islet. **Veterinary Microbiology**, v.80, n.3, p.235-245, 2001.

CUE, D.; LEI, M. G.; LEE, C. Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion *locus* in staphylococci. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.2, p. 1-13, 2012.

de JONG, H.K., et al. Host–pathogen interaction in invasive salmonellosis. **Plos Pathogens**, v.8 (10):e1002933. doi:10.1371/journal.ppat.1002933, 2012.

EL-TAYEB, M.A., et al. Prevalence, serotyping and antimicrobials resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.48, p.499-508, 2017.

FARDSANEI, F., et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG) 5-PCR and ERIC-PCR. **New microbes and new infections**, v. 14, p. 24-30, 2016.

FARDSANEI, F., et al. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. **Microbial Pathogenesis**, v.107, p.451-456, 2017.

FAVIER, G.I., et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp.

isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. **Food Control**, v.29, p.49-54, 2013.

FEASEY, N.A., et al. Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. **The Lancet**, v.379, p.2489-2499, 2012.

FOLEY, S.L.; ZHAO, S.; WALKER, R.D. Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. **Pathogens and Disease**, v.4, p. 253-276, 2007.

FOLEY, L.S.; LYNNE, A.M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p. 430-440, 2009.

FOLEY, S.L., et al. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.13, p.4273-4279, 2011.

FORTES, T.P., et al. Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v.71, n.2, p.219-227, 2012.

GAGNON, M., et al. Comparison of the Caco-2, HT-29 and the mucus-secreting HT29-MTX intestinal cell models to investigate *Salmonella* adhesion and invasion. **Journal of Microbiological Methods**, v.94, p.274-279, 2013.

GERSTEL, U.; RÖMLING, U. The *csqD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. **Research in Microbiology**. v. 154, p. 659–667, 2003.

GHOSAL, A., et al. *Salmonella* infection inhibits intestinal biotin transport: cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.309, n.2, p. G123-G131, 2015.

GIBSON, D. L., et al. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by *AgfD* and important for environmental persistence. **Journal of Bacteriology**, v.188, p. 7722-7730, 2006.

GOERING, R.V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10, p. 866-875, 2010.

- GORZYNSKI, E. A. Enterobacteriaceae e Vibrionaceae. **Guanabara Koogan**, Rio de Janeiro, 1997.
- GUIBOURDENCHE, M., et al. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p.26- 29, 2010.
- HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends Microbiology**. v. 13, p. 7-10, 2005.
- HAMILTON, S., et al. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. **Biomed Central Genomics**, v.10, p.599, 2009.
- HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, v.3, n.7, p.549-559, 2001.
- HAUCK, C.R., et al. Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. **European Journal of Cell Biology**, v.85, p.235-242, 2006.
- HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.294, p.95-102, 2004.
- HOLT, J.G., et al. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994.
- HU, G-Q., et al. Critical role for *Salmonella* effector SopB in regulating inflammasome activation. **Molecular Immunology**, v.90, p.280-286, 2017a.
- HU, Y., et al. Serovar diversity and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella enterica* recovered from retail chicken carcasses for sale in different regions of China. **Food Control**, v.81, p.46-54, 2017b.
- HUR, J., et al. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. **The Canadian Journal of Veterinary Research**, v.75, p.49-56, 2011.
- HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 819-830, 2012.

- IGLESIAS, M.A., et al. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.023>, (2017).
- ILYAS, B.; TSAI, C.N.; COOMBES, B.K. Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.7, 428, 2017.
- ISSENHUTH-JEANJEAN, S., et al. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v.165, n.7, p.526-530, 2014.
- JOO, H.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 12, p. 1503-1513, 2012.
- KAKATKAR, A.S., et al. Molecular characterization of antibiotic resistant *Salmonella* isolates from Indian foods. **Food Research International**, v. 44, p. 3272–3275, 2011.
- KAO, C-Y., et al. Molecular characterization of antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates: First identification of a plasmid carrying *qnrD* or *oqxAB* in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.50, p.214-223, 2017.
- KAWASAKI, K. Complexity of lipopolysaccharide modifications in *Salmonella enterica*: Its effects on endotoxin activity, membrane permeability, and resistance to antimicrobial peptides. **Food Research International**, v.45, p.493-501, 2012.
- KITCHEL, B., et al. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n 82009, p. 3365–3370, 2009
- KOTTWITZ, L.B.M., et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.32, n.1, p. 9-15, 2010.
- LAROCK, D.L.; CHAUDHARY, A.; MILLER, S.I. Salmonellae interactions with host processes. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, p.191-205, 2015.
- LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**. v.9, p.21-28, 2006.

LI, K., et al. Antimicrobial susceptibility, virulence gene and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium recovered from retail raw chickens, China. **Food Control**, v.72, p.36-42, 2017.

LIESEGANG, A.; TSCHÄPE, H. Modified pulsed-field gel electrophoresis method for DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* strains. **International Journal of Medical Microbiology**, v.291, p. 645-648, 2002.

LITRUP, E., et al. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica*. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10, p.1132-1139, 2010.

MAKA, Ł., et al. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2012. **Food Control**, v.36, p.199-204, 2014.

MATHOLE, M.A., et al. Presence, distribution, serotypes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* among pigs, chickens and goats in South Africa. **Food Control**, v.72, p.219-224, 2017.

MARIETTO-GANÇALVES, G.A.; ANDREATTI FILHO, R.F. Fagoterapia: uma opção de controle biológico para a salmonelose aviária. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v.10, n.1, p.06-13, 2012.

MARSHALL, K. C.; STOUT, R.; MITCHELL, R. Mechanism of initial events in the absorption of marine bacteria to surfaces. **Journal of General Microbiology**, v.68, p.337-348, 1971.

MELLOR, G.E., et al. Comparative analysis of attachment of Shiga-Toxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* strains to cultured HT-29 and Caco-2 cell lines. **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n.6, p.1796-1799, 2009.

MELCHIOR, M. B., et al. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.83–89, 2009.

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

- MEZAL, E.H., et al. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. **Food Microbiology**, v.38, p.67-74, 2014.
- MOORE, G.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL, D.A. Recovery and transfer of *Salmonella* Typhimurium from four different domestic food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p. 2273-2280, 2007.
- MOREIRA, C.G.; SPERANDIO, V. Interplay between the QseC and QseE bacterial adrenergic sensor kinases in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.80, n.12, p.4344-4353, 2012.
- MURASE, T., et al. Pulsed field gel electrophoresis-based subtyping of DNA degradation-sensitive *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Livingstone and serovar Cerro isolates obtained from a chicken layer farm. **Veterinary Microbiology**, v. 99, p. 139-143, 2004.
- MURRAY, I.A.; SHAW, W.V. O-Acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 1, 1997.
- NAIR, A., et al. Biofilm formation and genetic diversity of *Salmonella* isolates recovered from clinical, food, poultry and environmental sources. **Infection, Genetics and Evolution**, v.36, p.424-433, 2015.
- NOTERMANS, B.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. Existing and emerging foodborne disease. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 197- 205, 1992.
- NULTY, K.M., et al. Antimicrobial resistance monitoring and surveillance in the meat chain: A report from five countries in the European Union and European Economic Area. **Trends in Food Science & Technology**, v.58, p.1-13, 2016.
- O'BRYAN, C.A.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. Chapter 6 – Antimicrobial resistance in foodborne pathogens. **Food and Feed Safety Systems and Analysis**, p.99-115, 2018.
- OCHOA, I.M.F.; RODRIGUEZ, A.V. Mecanismos moleculares de patogenicidade de *Salmonella* spp. **Review Article**, v.47, n.1-2, p.25-42, 2005.

OLIVEIRA, A.P., et al. *Salmonella enterica*: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia, v.9, n.16, p.1947-1972, 2013.

OLIVEIRA, D.C.V., et al. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens Disease**, v.11, p.478-483, 2014.

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

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

PAUL, N.C.; SULLIVAN, T.S.; SHAH, D.H. Differences in antimicrobial activity of chlorine against twelve most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. **Food Microbiology**, v.64, p.202-209, 2017.

POOLE, K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 479-487, 2005.

PROCURA, F., et al. Prevalence, antimicrobial resistance profile and comparison of methods for the isolation of *Salmonella* in chicken liver from Argentina. *Food Research International*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.008>, (2017).

RAZZUOLI, E., et al. *Salmonella* serovar-specific interaction with jejunal epithelial cells. **Veterinary Microbiology**, v.207, p.219-225, 2017.

REYES, A.W.B., et al. The in vitro and in vivo protective effects of tannin derivatives against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Microbial Pathogenesis**, v.109, p.86-93, 2017.

RYAN, M.P.; O'DWYER, J.; ADLEY, C.C. Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*. **BioMed Research International**, Article ID 3782182, 6 pages. <https://doi.org/10.1155/2017/3782182>, 2017.

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, v.2, p.223-228, 2005.

SALEM, W.M., et al. Alterations in virulence and antibiotic resistant genes of multidrugresistant *Salmonella* serovars isolated from poultry: The bactericidal efficacy of *Allium sativum*. **Microbial Pathogenesis**, v.108, p.91-100, 2017.

SANCHEZ-MALDONADO, A. F., et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from two pork processing plants in Alberta, Canada. **International journal of food microbiology**, v. 241, p. 49-59, 2017.

SANTOS, F.B.O., et al. Genotypes, serotypes, and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* isolated from commercial North Carolina turkey farms. **Journal of Food Protection**, v.70, n.6, p.1328-1333, 2007.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v.19, n.1, p.14-56, 2004.

SHAH, D.H., et al. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, v.157, p.1428-1445, 2011.

SILVA, M.C.D. ; RAMALHO, L.S. ; FIGUEIREDO, E.T. *Salmonella* sp em ovos e carcaças de frangos “in natura” comercializadas em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v.18, n.121, p.80-84, 2004.

SINGH, P.; MUSTAPHA, A. Multiplex TaqMan® detection of pathogenic and multi-drug resistant *Salmonella*. **Intenational Journal of Food Microbiology**, v.166, p.213-128, 2013.

SKYBERG, J.A., LOGUE, C.M., NOLAN, L.K. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. **Avian Diseases**, v.50, p.77-81, 2006.

SOLANO, C., et al. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**. v. 43, p. 793–808, 2002.

Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>. Acessado em 15 de maio de 2015.

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

STEPANOVIĆ, S., et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v.40, p.175–179, 2000.

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

STOODLEY, P.; DAVIES, G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Reviews in Microbiology**, v.56, n.1, p.187-209, 2002.

TENOVER, F.C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis, p. criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233–2239; 1995.

TENOVER; F.C.; ARBEIT; R.D.; GOERING; R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections, p. A review for healthcare epidemiologists. Molecular typing working group of the society for healthcare epidemiology of America. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, p. 426-39, 1997.

TORPDAHL, M., et al. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p. 173-184, 2005.

TOZZO, K., et al. Migration of *Salmonella* serotypes Heidelberg and Enteritidis in previously frozen chicken breast meat. **Food Microbiology**, v.69, p.204-211, 2018.

TRABULSI, L.B.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6<sup>a</sup> ed. **Atheneu**, 2015.

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

UTRARACHKIJ, F., et al. Genetic diversity and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis clinical isolates in Thailand. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 22, n. 4, p. 209-215, 2016.

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.

VERBRUGGHE, E., et al. Host stress drives *Salmonella* recrudescence. **Scientific Reports**, v.6, 20849, 2016.

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

VILLA-ROJAS, R., et al. Biofilm forming *Salmonella* strains exhibit enhanced thermal resistance in wheat flour. **Food Control**, v.73, p.689-695, 2017.

XIE, X., et al. Genetic analysis of *Salmonella enterica* serovar Gallinarum biovar Pullorum based on characterization and evolution of CRISPR sequence. **Veterinary Microbiology**, v.203, p.81-87, 2017.

ZADERNOWSKA, A.; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. Prevalence, biofilm formation and virulence markers of *Salmonella* sp. and *Yersinia enterocolitica* in food of animal origin in Poland. **LWT – Food Science and Technology**, v.75, p.552-556, 2017.

ZHAO, X., et al. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **Royal Society of Chemistry Advances**, v.7, p.36670-36683, 2017.

ZHU, Y., et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China. **International Journal of Food Microbiology**, v.259, p.43-51, 2017.

ZIEBELL, K., et al. Subtyping of Canadian isolates of *Salmonella* Enteritidis using Multiple Locus Variable Number Tandem Repeat Analysis (MLVA) alone and in combination with Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) and phage typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 139, p. 29-36, 2017.

ZOGAJ, X., et al. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v.39, p.1452-1463, 2000.

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

WATERS, C.M.; BASSLER, B.L. Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 319-346, 2005.

WEBER, S.; PFALLER, M.A.; HERWALDT, L.A. Role of molecular epidemiology in infection control. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 11, p. 257-78, 1997.

WONG, G.C.L.; O'TOOLE, G. A. All together now: Integrating biofilm research across disciplines. **MRS Bulletin**, v. 36, p. 339–342, 2011.

WOOD, M.W., et al. Structural analysis of *Salmonella enterica* effector protein SopD. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1698, p.219-226, 2004.

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