

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

DETECÇÃO DOS GENES *integron*, *invA* E *spvC* EM *Salmonella* Enteritidis
PROVENIENTE DE MATERIAL AVÍCOLA E TRANSFERÊNCIA
HORIZONTAL DO GENE *integron* ENTRE ENTEROBACTÉRIAS

ADRIANO SAKAI OKAMOTO

BOTUCATU - SP

Maio – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA VETERINÁRIA

**DETECÇÃO DOS GENES *integron*, *invA* E *spvC* EM *Salmonella* Enteritidis
PROVENIENTE DE MATERIAL AVÍCOLA E TRANSFERÊNCIA
HORIZONTAL DO GENE *integron* ENTRE ENTEROBACTÉRIAS**

ADRIANO SAKAI OKAMOTO

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, *Campus* de Botucatu, para obtenção do Título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Patologia Aviária.

Orientador: Profº Assistente Doutor Raphael Lucio Andreatti Filho

BOTUCATU - SP

2009

Composição da Banca

ADRIANO SAKAI OKAMOTO

**Detecção dos Genes *integron*, *invA* e *spvC* em *Salmonella* Enteritidis
Proveniente de Material Avícola e Transferência Horizontal do Gene
integron entre Enterobactérias**

Comissão examinadora:

Orientador:

Profº Ass. Dr. Raphael Lucio Andreatti Filho

Membros:

Profº Marcelo Vasconcelos Meireles

Profº Edna Tereza de Lima

Profª Noeme Sousa Rocha

Profº Julio Lopes Sequeira

Botucatu, 20 de maio de 2009.

À Eluane, minha esposa, que por muitas vezes compreendeu a minha ausência e dedicação a esse projeto.

Agradeço por todos os momentos verdadeiros de amor, amizade, carinho, paz e conquistas que tivemos.

Ao meu filho querido que mesmo não compreendendo minha ausência, me proporcionou inúmeros momentos de paz e tranquilidade.

“Cada minuto valeu a pena, todos os minutos...”

DEDICO.

Agradecimentos

Aos meus pais Rachel Sakai Okamoto e Teruo Okamoto, pela ajuda em todos os dias de minha vida e principalmente pela educação e incentivo aos estudos;

Ao meu orientador Profº Raphael Andreatti Filho, pela paciência, estímulo e orientação no desenvolvimento desse projeto;

Aos docentes do Serviço de Patologia da FMVZ – Unesp, Profº Julio Lopes Sequeira, Profª Renée Laufer Amorim e Profª Noeme Sousa Rocha, pelo apoio e atenção prestada durante a realização desse projeto;

Às secretárias da Pós-graduação e do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ – Unesp, pela atenção e orientação prestada;

Aos Residentes e Pós Graduandos da Ornitopatologia e Patologia;

Aos meus amigos e amigas que de alguma forma tiveram participação nesse projeto, nos nomes de Maury Raul, Profº Raphael, Profº Julio, Profª Renée, Profª Noeme, Ticiane Rocha, Anita Meconi, Edna, Thais, Roberta, Marcela, Ana Paula, Camila, e Guilherme.

A todos,

meu eterno agradecimento, na certeza de um dia poder retribuir a ajuda prestada.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIACÕES

RESUMO

ABSTRACT

	Páginas
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	02
1.1. Salmonelose e Saúde Pública	02
1.2. Fatores de virulência da <i>Salmonella</i> Enteritidis	04
1.2.1. Gene <i>invA</i>	05
1.2.2. Gene <i>spvC</i>	05
1.3. Fator de resistência a antimicrobianos	07
1.4. Transferência horizontal de genes	11
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Local	16
3.2. Cepas bacterianas	16
3.3. Teste de resistência a antimicrobianos	17
3.4. Condições de crescimento bacteriano	17
3.4.1. Concentração de nutrientes	18
3.4.2. Variação de pH	18
3.4.3. Variação de temperatura	18

3.5. Biologia Molecular	20
3.5.1. Preparação do lisado bacteriano	20
3.5.2. Oligonucleotídeos	20
3.5.3. Amplificação do DNA bacteriano	21
3.5.4. Detecção do produto amplificado (eletroforese em gel de agarose)	22
3.6. Transferência horizontal de genes	22
4. RESULTADOS	27
4.1. Biologia Molecular – Detecção do produto amplificado	27
4.2. Condições de crescimento bacteriano	29
4.2.1. Concentração de nutrientes	29
4.2.2. Variação de pH	29
4.2.3. Variação de temperatura	30
4.3. Teste de resistência a antimicrobianos	34
4.4. Detecção de gene de resistência a antimicrobianos	37
4.5. Transferência horizontal de genes	37
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÃO	46
7. BIBLIOGRAFIAS	48

ANEXOS

TRABALHOS CIENTÍFICOS

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Delineamento experimental demonstrando o cultivo das cepas de *Salmonella* Enteritidis em meio com variação de pH, concentração de nutrientes e temperatura 19
- FIGURA 2. Antibiograma: a) *Escherichia coli* (doadora) resistente e b) *Salmonella* Enteritidis (receptora) sensível à tetraciclina, ampicilina e trimetoprima 24
- FIGURA 3. Placa de petri contendo ágar verde brilhante semeada com lavado proveniente das cepas de *Salmonella* Enteritidis (colônias rosadas, lactose -) e *Escherichia coli* (colônias amareladas, lactose +) 25
- FIGURA 4. Genes de virulência *spvC* (colunas 1, 2, 3 e 4) e *invA* (colunas 5, 6 e 7). Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder (coluna 8) 28
- FIGURA 5. Número de cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) portadoras dos genes de virulência *invA* e *spvC* em diferentes concentrações de nutrientes 31
- FIGURA 6. Número de cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) portadoras dos genes de virulência *invA* e *spvC* em diferentes níveis de pH 32

FIGURA 7. Número de cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) portadoras dos genes de virulência <i>invA</i> e <i>spvC</i> em diferentes temperaturas de cultivo	33
FIGURA 8. Número de cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de material avícola resistentes a antimicrobianos	36
FIGURA 9. Antibiograma: a) <i>Salmonella</i> Enteritidis (receptora) e b) <i>Escherichia coli</i> (doadora) resistentes à tetraciclina, ampicilina e trimetoprima	38
FIGURA 10. Gel de agarose mostrando as bandas do gene de resistência antimicrobiana (<i>integron</i> classe 1). Na coluna 1 o marcador de peso molecular, na coluna 2 o controle positivo <i>Escherichia coli</i> (doadora) e nas colunas 3, 4, 5 e 6 cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis receptoras positivas	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Oligonucleotídeos (primers) referentes aos genes de resistência a antimicrobianos (<i>integrons</i>) e de virulência (<i>invA</i> e <i>spvC</i>) de <i>Salmonella</i> Enteritidis	21
TABELA 2. Presença dos genes de virulência <i>spvC</i> e <i>invA</i> em <i>Salmonella</i> Enteritidis e sua multiplicação em diferentes concentrações de nutrientes	29
TABELA 3. Presença dos genes de virulência <i>spvC</i> e <i>invA</i> em <i>Salmonella</i> Enteritidis e sua multiplicação em diferentes níveis de pH	30
TABELA 4. Presença dos genes de virulência <i>spvC</i> e <i>invA</i> em <i>Salmonella</i> Enteritidis e sua multiplicação em diferentes temperaturas de cultivo	30
TABELA 5. Perfil de resistência e sensibilidade de 100 cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de material avícola	34

ANEXOS

ANEXO I

TABELA 1 . Presença dos genes de virulência <i>spvC</i> e <i>invA</i> em <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) e sua multiplicação em diferentes concentrações de nutrientes	61
---	----

ANEXO II

TABELA 1. Presença dos genes de virulência <i>spvC</i> e <i>invA</i> em <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) e sua multiplicação em diferentes níveis de pH	64
---	----

ANEXO III

TABELA 1. Presença dos genes de virulência <i>spvC</i> e <i>invA</i> em <i>Salmonella</i> Enteritidis (SE) e sua multiplicação em diferentes temperaturas de cultivo	67
--	----

LISTA DE ABREVIACÕES

pH		potencial de hidrogênio
PCR		reação em cadeia da polimerase
SE		<i>Salmonella</i> Enteritidis
S.		<i>Salmonella</i>
DNA		ácido desoxirribonucleico
spv		<i>Salmonella plasmide virulence</i>
inv		invasion gene
UFC		unidades formadoras de colônia
V		volts
mg/mL		miligrama por mililitro
µg/mL		micrograma por mililitro
FMVZ		Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Unesp		Universidade Estadual Paulista
pb		pares de base
rpm		rotação por minuto
PBS		solução salina fosfatada tamponada
mL		mililitro
pmoles		picomoles
g/L		grama por litro
U		unidade
U/µL		unidade por microlitro
°C		grau Celsius
MgCl₂		Cloreto de magnésio
BHI		infusão cérebro coração
µM		micromolar
µg		micrograma
dNTP		desoxinucleotídeo trifosfato
µL		microlitro
AVB		Ágar verde brilhante
MH		Mueller Hinton

mMmilimolar
HClÁcido clorídrico
Tristris(hidroximetil)aminometano
KClCloreto de Potássio
E. coli*Escherichia coli*

OKAMOTO, A. S. Detecção dos genes *integron*, *invA* e *spvC* em *Salmonella* Enteritidis proveniente de material avícola e transferência horizontal do gene *integron* entre enterobactérias. Tese de Doutorado (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, 2009.

RESUMO

Neste trabalho foram analisadas 100 cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) isoladas de material avícola, visando à detecção dos genes de virulência *spvC* e *invA* e resistência a antimicrobianos *integron* classe 1. Comparando-se com a possível expressão dos fatores de virulência para sobrevivência em condições impróprias de temperatura, pH e concentração de nutrientes e o teste de inibição em placa, respectivamente. Também a capacidade de transferência horizontal do gene *integron* classe 1 foi avaliada em SE. Das cepas analisadas, duas apresentaram os genes *spvC* e *invA*, simultaneamente, com uma provável expressão destes sendo verificada no crescimento com pH 10,0 ou temperatura de 25°C. Porém em relação à concentração de nutriente, ambas as cepas não cresceram na menor concentração (0,5%). Não houve relação direta entre a presença do gene *integron* classe 1 com a multiresistência de SE aos 14 antimicrobianos testados, já que 80% das cepas pesquisadas foram resistentes a até três antimicrobianos e não apresentaram o referido gene. Entretanto, a transferência horizontal desse gene e da resistência antimicrobiana foi realizada *in vitro*, de um *Escherichia coli* para uma *Salmonella* Enteritidis, demonstrando a capacidade de disseminação do gene presente em *integron* classe 1.

Palavras chave: *Integron*, *invA*, multiresistência, *Salmonella* Enteritidis, *spvC*, transferência de gene.

OKAMOTO, A. S. Detection of the genes *integron*, *invA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis from avian material and horizontal transfer of the *integron* gene between enterobacteria, 2009.

ABSTRACT

In this work, 100 strains of *Salmonella* Enteritidis (SE) isolated from avian material were studied, aiming to detect the genes of virulence *spvC* and *invA*, as well as the antimicrobial resistance type 1 *integron* genes using the polymerase chain reaction (PCR), comparing it with the possible expression of the virulence factors to survive under inappropriate conditions of temperature, pH and nutrient concentration, and the plaque inhibition assay, respectively. Capacity of horizontal transfer of type 1 *integron* gene was also evaluated in SE. Two of the analyzed strains showed *spvC* and *InvA* genes simultaneously, with a probable expression verified through growing in pH 10.0 or 25°C temperature. However, regarding to nutrient concentration, the aforementioned strains did not grow at the lowest concentration (0.5%). There was no direct relation between type 1 *integron* gene and the multiresistance of SE to the 14 tested antibiotics, because 80% of the strains did not showed the gen, but was resistant till three antibiotics. However, horizontal transfer of this gene was performed *in vitro*, showing the capacity of dissemination of the type 1 *integron* gene between bacteria.

Key words: Gene transfer, *integron*, *invA*, multiresistance, *Salmonella* Enteritidis, *spvC*.

*“Se pensas perder, perdido estás.
Quem não confia em si, marcha para trás.
A força que te impele para frente é decisão firmada em tua mente.
A tua trajetória são exaltos sinos da vitória”.*

Dr. Ailton Silva

Introdução e Revisão de Literatura

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Salmonelose e saúde pública

Salmonelose é o termo que designa um grande grupo de doenças aviárias agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella* (GAST, 1997).

Estas bactérias são bastonetes Gram negativos, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, espécie *enterica*, subespécie *enterica*, sorotipo Enteritidis e na grande maioria móveis. São aeróbios e anaeróbios facultativos, fermentam açúcares com produção de gás e H₂S, possuindo complexa constituição antigênica (antígenos somático “O”, flagelar “H” e capsular “K”) (HOLMES & GROSS, 1990; HOLT *et al.*, 1994; GAST, 1997; BARROW, 2000).

Segundo Poppe (1999), alguns sorotipos de *Salmonella* estão associados com maior frequência ou adaptados a hospedeiros específicos. Como a *Salmonella* Cholerasuis que causa pneumonia, enterocolite e septicemia em suínos; *S. Dublin* causando aborto, enterite mucohemorrágica e necrótica, pneumonia e septicemia em bovinos; *S. Abortusequi* relacionado ao aborto em equinos; *S. Abortusovis* causando aborto em ovinos; *S. Gallinarum* levando à febre tifóide em galinhas e *S. Pullorum* determinando pulorose em galinhas e perus. No homem, *S. Typhi* e *S. Paratyphi* causam febre tifóide. Existem mais de 2.300 sorotipos de *Salmonella*, incluindo-se a *S. Enteritidis* que é um dos muitos sorotipos não adaptados a hospedeiros específicos, podendo determinar salmonelose em mais de uma espécie.

Dentre as infecções alimentares a salmonelose é a de maior ocorrência no Brasil e no mundo (FRANCISCO *et al.*, 2007; MEHRABIAN & JABERI, 2007). Segundo Gast (1997) e Tood (1997), a grande incidência de infecção alimentar no homem se deve a ingestão de produtos de origem aviária contaminados ou indevidamente preparados, visto que as aves podem ser

reservatórios de *Salmonella* spp. Geralmente desencadeia uma doença com recuperação espontânea, com presença de cólicas abdominais, vômito, febre e diarreia, mas particularmente nas crianças e idosos o quadro em geral é mais grave (SAMUEL *et al.*, 2007).

A *Salmonella* pode ser introduzida nas granjas por meio de rações contaminadas, principalmente as que contêm matéria prima de origem animal (HOFER *et al.*, 1998), por via transovariana ou contaminação da casca do ovo, pela água, contato direto com aves ou portadores contaminados, vetores como insetos, roedores, pessoas e equipamentos (BORLAND, 1975; GAST, 1998).

Durante o processamento dos frangos de corte, a presença de *Salmonella* no conteúdo intestinal, pele e penas das aves resultam em consequente contaminação da carne. A ingestão de 10 unidades formadoras de colônia (UFC) dessa bactéria pode causar a salmonelose em humanos adultos (BRYAN & DOYLE, 1995).

De acordo com Fortuna & Franco (2005) a presença de *Salmonella* spp. em amostras de carne, armazenadas a 0°C e -18°C por 90 dias indica que estas bactérias sobrevivem a períodos longos de armazenamento, mesmo sob baixas temperaturas. Estudos de casos de salmonelose constataam que ovos crus são importantes fatores de risco da infecção no homem (HELDBERG *et al.*, 1993; MORSE *et al.*, 1994; PASSARO *et al.*, 1996).

A patogenicidade da *Salmonella* depende de uma série de fatores associados à bactéria, à ave e às condições de criação. A associação e a penetração da bactéria na mucosa digestiva é um pré-requisito para a infecção sistêmica (BARROW, 1995; RYCHLIK *et al.*, 1998).

Até meados da década de oitenta, a *S. Enteritidis* era isolada de animais e humanos com baixa frequência em muitos países. No final desta década ocorreu um aumento repentino da prevalência deste sorotipo isolado de infecções humanas ultrapassando a *S. Typhimurium* que, até então, ocupava o

primeiro lugar (POPPE, 1999; RODRIGUE *et al.*, 1990; SILVA, 2004). Este aumento da *S. Enteritidis* em casos humanos pode ser constatado pelo Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas do FIOCRUZ - Brasil (QUINTAES *et al.*, 1997).

1.2. Fatores de virulência da *Salmonella* Enteritidis

As bactérias têm alterado seu material genético para adaptar-se e sobreviver em diferentes condições. A transferência horizontal de material genético apresenta papel importante na aquisição de várias características entre diferentes gêneros ou espécies bacterianas (ABIGAIL & DIXIE, 2002). Para virulência da *Salmonella* há necessidade da expressão de numerosos genes, os quais codificam alguns fatores, podendo estar localizados em elementos genéticos transmissíveis, como os plasmídeos, bacteriófagos ou transposons, assim como podem fazer parte de regiões específicas no cromossomo da bactéria (HACKER *et al.*, 1997).

Bactérias patogênicas regulam a expressão de genes necessários para virulência, estando frequentemente associada à resposta de condições ambientais muito específicas. Vários estudos demonstraram que *Salmonella* ligada a macrófagos expressa proteínas diferentes quando cresce em meios de cultura (ABSHIRE & NEIDHARDT, 1993; BUCHMEIER & HEFFRON, 1990; BURNS-KELIHER *et al.*, 1998). A virulência da *Salmonella* está ligada a combinação de fatores cromossômicos e plasmidiais. O gene de invasão *invA* possibilita a invasão da *Salmonella* em culturas de células epiteliais (GALAN & CURTISS III, 1989), enquanto o *operon spvRABCD*, contendo cinco genes e presente em plasmídios associados com muitos sorotipos, determina o aumento da severidade da enterite e persistência em sítios extra-intestinais (LIBBY *et al.*, 2000).

O gene de invasão (*inv*) e a presença de plasmídeos de virulência (*spv*) são essenciais para a expressão total da virulência de *S. Typhimurium* em camundongos. Porém, a relação entre a presença dos genes *invA* e *spvC* e

a redução da invasibilidade de *Salmonella* isolada de diversas fontes associadas a frangos de corte, ainda não foi determinada (SWAMY *et al.*, 1996).

1.2.1. Gene *invA*

Para o processo de infecção é necessário fator de virulência da *Salmonella* spp., sendo que uma das primeiras etapas da patogenicidade desta bactéria é a invasão das células do epitélio intestinal. O processo desta invasão é muito complexo e muitos genes estão envolvidos. A maioria destes genes está localizada no cromossomo da bactéria, em um local denominado SPI-1 (*Salmonella* Pathogenicity Islands-1) (GINOCHIO *et al.*, 1994; HACKER *et al.*, 1997). Estas ilhas de patogenicidade são formadas por seqüências específicas de DNA bacteriano, que codificam fatores determinantes de virulência responsáveis por estabelecer interações específicas com o hospedeiro (MARCUS *et al.*, 2000).

Sorotipos de *Salmonella* que não possuem o gene *invA* são incapazes de expressar os genes *invABC*, tornando-os impossibilitados de invadir células de mamíferos (GALÁN *et al.*, 1992).

Rahn e colaboradores (1992) concluíram após detectar o gene *invA* por meio da PCR que este gene pode ser utilizado para diferenciar *Salmonella* spp. de outros microrganismos, pois a seqüência de nucleotídeos contida neste gene era única para as 630 cepas de *Salmonella* pertencentes a 100 diferentes sorotipos analisados. Entretanto, duas cepas de *S. Litchfield* e duas de *S. Senftenberg* foram negativas para a presença deste gene.

1.2.2. Gene *spvC*

Plasmídeos envolvidos com virulência também estão relacionados com a sobrevivência e o crescimento da bactéria em células do hospedeiro, embora aparentemente não estejam envolvidos na interação inicial entre a

Salmonella e a mucosa intestinal. Contudo, os plasmídios habilitam a bactéria a persistir nas células do sistema retículo endotelial, como baço e fígado (GULIG & CURTISS III, 1987; SWAMY *et al.*, 1996).

Não foram necessários plasmídios de virulência de *Salmonella* para ocorrer o deslocamento da bactéria através da mucosa intestinal de camundongos, demonstrando que cepas de *Salmonella* sem plasmídios foram capazes de colonizar e persistir no baço e fígado, embora na fase sistêmica da infecção não tenha havido crescimento (GUILOTEAU *et al.*, 1996).

Vários sorotipos de *Salmonella* possuem plasmídios de virulência de diferentes tamanhos e composição genética, no entanto, todos possuem uma região altamente conservada de 7,8 kb (GUINEY *et al.*, 1995; LIBBY *et al.*, 1997; ROTGER & CASADÉSUS, 1999). A análise da sequência de nucleotídeos desta região revelou cinco genes denominados *spv* (*Salmonella* plasmide virulence): *spvR*, A, B, C e D (GULIG *et al.*, 1993). O *operon spv* promove a sobrevivência e crescimento da bactéria no baço, fígado e nódulos linfáticos de camundongos infectados oralmente (HEFFERMAN *et al.*, 1987). Os quatro genes estruturais, *spvA*, *spvB*, *spvC* e *spvD*, são transcritos como um *operon* e ativados pelo produto do gene *spvR*, o qual é produzido na fase estacionária de crescimento, provavelmente devido ao acúmulo de produtos metabólicos nesta fase (VALONE *et al.*, 1993).

Segundo Gulig e colaboradores (1993), o gene *spvC* aumenta a média de crescimento nas células do hospedeiro. Valone e colaboradores (1993) constataram que nenhuma proteína *spv* foi expressa quando *S. Dublin* teve mutações no gene *spvC*, sendo que a perda na expressão das proteínas *spvA* e *spvB* pode ter ocorrido, segundo os autores, devido ao rompimento da estabilidade de transcrição ou porque o *spvC* é requerido para expressão de outras proteínas.

O *operon spv* é requerido para a fase sistêmica da doença em hospedeiros específicos, como o sorotipo Choleraesuis em suínos (DANBARA

et al., 1992). Bactérias patogênicas (com *operon spv*) expressam fatores de virulência que as ajudam a sobreviver em condições hostis, como temperatura elevada, pH ácido e privação de nutrientes (VALONE *et al.*, 1993).

1.3. Fator de resistência aos antimicrobianos

A resistência microbiana é a perda da sensibilidade de um microrganismo a antimicrobiano ao qual que originalmente era susceptível. Esta resistência pode ser adquirida por mutações no DNA cromossomal ou por aquisição de material genético extracromossômico por meio de plasmídeos e transposons (VÁZQUEZ *et al.*, 2002). A resistência crescente das bactérias patogênicas aos antimicrobianos tem causado preocupação de que o uso generalizado de agentes antimicrobianos na produção animal possa promover o desenvolvimento de bactérias resistentes ou de que genes de resistência possam ser transferidos para bactérias que causam doença no homem (WEGENER *et al.*, 1997).

No Brasil, a adição de antimicrobianos na ração de aves de corte e de postura é considerada uma prática eficaz, tendo sido amplamente utilizada. Assim, as pesquisas sobre formas alternativas para incrementar a produtividade das aves têm sido prioridade, principalmente, no que se refere à utilização de probióticos (EDENS, 2003). A União Européia já vem tomando providências nesse sentido, onde desde janeiro de 2006 está proibida a utilização de antibióticos como promotores de crescimento em animais de produção (MISSOTTEN, 2007).

A Organização Mundial da Saúde declara que só teremos antimicrobianos efetivos por apenas mais 20 anos e que 25% a 35% de pacientes hospitalizados fazem uso de antimicrobianos em algum momento de sua internação. Apesar dos problemas apontados com o uso destes fármacos, estes continuam sendo usados de forma inapropriada, afetando não somente os pacientes, como também a microbiota hospitalar (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Um grande problema de saúde pública enfrentado nas últimas décadas foi o surgimento e a disseminação de resistência a antimicrobianos em populações

bacterianas, principalmente de origem hospitalar. Atualmente, registra-se um aumento significativo na frequência de isolamento de bactérias que eram sensíveis às drogas de rotina usadas na clínica, mas que agora se apresentam resistentes a todos ou quase todos os fármacos disponíveis no mercado (NOGUEIRA *et al.*, 1999).

O primeiro relato de resistência a uma droga antimicrobiana data de 1907, nos estudos de Paul Ehrlich, que registrou o aparecimento de tripanossomídeos resistentes ao quimioterápico “rosanilina”. O mesmo se deu com a resistência bacteriana que acompanhou a utilização pela Medicina Humana e Veterinária da sulfonamida e penicilina a partir da década de 40. A cada dia a preocupação com o uso adequado dos antimicrobianos vem crescendo. Um dos aspectos negativos quanto ao uso de antimicrobianos é a seleção de microrganismos multiresistentes, limitando as possibilidades terapêuticas e aumentando não só as taxas de letalidade, como também os custos de tratamento (NOGUEIRA *et al.*, 2005). Atualmente, podem-se observar vários sorotipos de *Salmonella* envolvidos em casos de multiresistência a diversos antimicrobianos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2000).

Para que o Brasil tenha uma avicultura competitiva e crescente, tanto no mercado interno como no externo, é necessário que as agroindústrias tenham um adequado sistema de biossegurança, com regras bem definidas em relação ao manejo e controle sanitário, minimizando assim o uso de antimicrobianos. Cepas de *S. Enteritidis* isoladas de aves têm demonstrado alta sensibilidade aos antibióticos de uso comum na avicultura, incluindo as quinolonas. Entretanto, observa-se o aumento da resistência antimicrobiana e multirresistência cruzada em cepas de origem humana. O uso de determinados tipos de antibióticos em aves, particularmente as quinolonas, tem contribuído para a manutenção de lotes positivos para *S. Enteritidis* (SILVA, 2004). Frangos de corte podem funcionar como reservatórios de genes de resistência a antibióticos importantes em medicina veterinária e humana (PESSANHA & GONTIJO FILHO, 2001).

Em *S. Typhimurium*, *Gallinarum*, *Enteritidis* e *Choleraesuis* demonstraram-se a presença de plasmídeos de alto peso molecular (50 a 100 kb), onde há genes que codificam toxinas assim como genes que conferem multiresistência a diferentes antimicrobianos (BARROW & LOVELL, 1989; VÁZQUEZ *et al.*, 2002; TAKESHI *et al.*, 2001). A família *Enterobacteriaceae* contém gêneros que habitam o trato intestinal do homem e outros animais, incluindo espécies não patogênicas (comensal) e patogênicas (HOWARD *et al.*, 1987). Muitas espécies desta família presentes no trato intestinal são freqüentemente expostas a diferentes antimicrobianos, existindo potencial para a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos (GOLDSTEIN, 2001).

São identificados diferentes elementos genéticos que participam na transferência de genes de resistência, sendo que os mais conhecidos são os plasmídeos (AMABILE-CUEVAS & CHICUREL, 1992), transposons (SALYERS *et al.*, 1995) e bacteriófagos (STOKES & HALL, 1989). A transferência de genes de resistência entre diferentes bactérias pode ocorrer por conjugação (ZATYKAA & THOMASA, 1998), transdução (THOMPSON, 1994) e transformação (COHENS *et al.*, 1972). Na conjugação, se transferem genes de resistência de uma bactéria à outra por meio de um plasmídeo. Na transdução, um gene de resistência se integra a uma bactéria por meio de um vírus e por último, a transformação, onde há captação e assimilação de genes liberados no meio externo por bactérias mortas (VÁZQUEZ *et al.*, 2002). A resistência antimicrobiana é feita por *integrons* que ocorrem nos plasmídeos ou que são integrados dentro do cromossomo da bactéria (GOLDSTEIN *et al.*, 2001). É bem conhecida a função dos plasmídeos e transposons na multiresistencia das bactérias aos antimicrobianos e na disseminação natural dos determinantes de resistência (AMABILE-CUEVAS & CHICUREL, 1992).

Integrons são elementos genéticos capazes de integrar e expressar genes de resistência aos antimicrobianos, sendo identificados em plasmídeos e transposons e que freqüentemente contém um ou mais genes que codificam resistência a antimicrobianos (STOKES & HALL, 1989). Os *integrons*

funcionam como sistemas de captação de genes que conferem vantagens seletivas para a bactéria. Dada a sua capacidade de reconhecer uma ampla variedade de sequências de recombinação, sua capacidade de intercâmbio e origem remota, estas estruturas permitem às bactérias rápida adaptação às mudanças ecológicas, cujo exemplo mais recente corresponde sem dúvida à adaptação à era moderna da quimioterapia (GONZÁLEZ *et al.* 2004). González e colaboradores (1998) publicaram as primeiras evidências da presença de *integrons* em bacilos Gram negativos isolados de resíduos biológicos em hospitais chilenos.

Integrons são comumente associados com a família *Enterobacteriaceae*. Quatro classes de *integrons* são conhecidas (1, 2, 3 e 4), sendo que a classe 1 é a predominante entre os membros desta família tanto na microbiota normal como na patogênica dos animais (GOLDSTEIN *et al.*, 2001). Baseados nos resultados encontrados com diferentes sorotipos do gênero *Salmonella*, a maioria dos isolamentos obtidos de casos clínicos são resistentes a vários antimicrobianos e portam gene da classe 1, envolvido na multiresistência antimicrobiana (VÁZQUEZ-NAVARRETE *et al.*, 2005). As cepas que apresentam *integrons* são as mesmas que apresentam os padrões de resistência mais amplos (MUÑOZ *et al.*, 2000).

Stokes & Hall (1989) demonstraram que as sequências de DNA que delimitam as regiões com genes de resistência representam zonas conservadas, com um extremo 5' conservado de 1,36 kb e um extremo 3' conservado de 2 kb. Estes genes de resistência estão presentes em *integrons* da classe 1, enquanto as demais classes de *integrons* relacionadas com resistência antimicrobiana não possuem extremos 3' altamente conservados, já que suas sequências podem variar por inserção ou deleção de alguns genes ou sequências de inserção (GONZÁLEZ *et al.*, 2004).

Em decorrência da descoberta e estudo da transferência de gene de resistência entre bactérias, houve um extraordinário avanço na ciência, culminando com o desenvolvimento de técnicas moleculares que permitem o

estudo e mapeamento de cromossomos e a subsequente manipulação de genes, aplicáveis tanto em eucarióticos quanto em procarióticos (NOGUEIRA *et al.*, 1999).

1.4. Transferência horizontal de genes

As bactérias podem adquirir resistência aos antimicrobianos por meio da transferência horizontal de genes de resistência, característica muito frequente entre as bactérias (GÓMEZ, 1998; TOP *et al.*, 2000).

Transferência horizontal de genes é a transferência de material genético diretamente para uma célula viva ou um organismo, seguido de sua expressão. A transferência horizontal de genes desempenha o papel principal na evolução dos genomas, pois é considerada com mais importante do que a alteração da função do gene através de mutações pontuais na adaptação de bactérias a novos ambientes (UETANABARO & GÓES-NETO, 2006).

A transferência horizontal de genes é um dos campos mais intensamente estudados em biociência desde 1940, pois esse assunto não é só de interesse para o conhecimento das implicações evolutivas, mas, também, tornou-se muito importante no estudo de risco da liberação acidental ou deliberada de organismos geneticamente modificados no ambiente (DROGÉ *et al.*, 1998).

Evidências circunstanciais indicam o movimento de genes entre diferentes espécies durante a evolução. Um evento de transferência horizontal de genes entre plantas e bactérias foi descrito por Meyer e colaboradores (1995); entre células humanas e bactérias, por Holmgren e Bränden (1989); entre diferentes espécies de leveduras, por Hardy e Clark-Walker (1991); entre protistas e bactérias, por Smith e colaboradores (1992) e entre fungos e bactérias por Klotz e colaboradores (1997).

O uso de plantas geneticamente modificadas na agricultura tem aumentado a preocupação sobre o impacto dos genes modificados na saúde

humana e no meio ambiente. Isso é baseado na hipótese que, se esses genes possam ser transferidos para microrganismos, eles poderiam ser disseminados no ambiente. Como, por exemplo, já é conhecida a existência de microrganismos patogênicos oportunistas de origem do solo resistentes a novos antibióticos (COURVALIN, 1994).

Segundo os estudos de Salyers e Ama´bile-Cuervas (1997), existem evidências que apóiam a manutenção estável de genes de resistência mesmo na ausência de pressão seletiva. Os genes de resistência e seus vetores são facilmente adquiridos, porém são dificilmente perdidos. Essa facilidade de aquisição e transferência de genes de resistência é favorecida pela cooperação entre diferentes elementos de transferência genética que atuam na transferência horizontal de genes de determinantes de resistência a antimicrobianos (UETANABARO & GÓES-NETO, 2006).

Genes de resistência são codificados por plasmídios e estes são transferidos frequentemente entre espécies, sendo comum em *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp. e *Serratia* spp., sendo sua disseminação aparentemente inevitável (DE CHAMPS *et al.*, 1991; PHILIPPON, *et al.*, 1989).

*“Quem sabe concentrar-se numa coisa e insistir nela como único objetivo,
obtem, ao fim e ao cabo, a capacidade de fazer qualquer coisa”*

Mahatma Gandhi

Objetivos

2. OBJETIVOS

- Detectar genes responsáveis pela virulência da *Salmonella* Enteritidis (*invA* e *spvC*) através da Reação em Cadeia da Polimerase correlacionando com sua sobrevivência em condições extremas de temperatura, pH e privação de nutrientes.
- Detectar gene relacionado com a resistência a antimicrobianos presentes em *integrons* classe 1 através da Reação em Cadeia da Polimerase, correlacionando com *Salmonella* Enteritidis multiresistente, observado no antibiograma.
- Determinar a ocorrência da transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos (*integron* classe 1), entre *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis.

*“Lembre-se que a única coisa em nossas vidas
que jamais recuperamos é o tempo,
por isso, jamais o desperdice.
Lembre-se também que na sua hora de preguiça,
alguém está estudando em seu lugar!”*

E. T. O.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, *Campus* de Botucatu.

3.2. Cepas bacterianas

Utilizou-se 100 cepas de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (SE) isoladas de vísceras (fígado, ceco, saco vitelino ou ovário), suabes de arrasto e carcaças (frangos ou matrizes pesadas). Estas bactérias foram sorotipadas no Instituto Adolfo Lutz em São Paulo e então estocadas em ágar nutriente.

As cepas de SE foram reativadas em tubos contendo 3 mL de infusão cérebro coração (BHI) e incubadas em aerobiose a 41°C por 24 horas. Em seguida, as cepas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar verde brilhante (AVB), incubadas como descrito anteriormente e permanecendo à temperatura de 4°C até o momento de uso.

Utilizou-se como bactéria doadora cepa de *Escherichia coli* isolada de estação de tratamento de água em Porto-Portugal, identificada na Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa, positiva para *integron*-classe 1 e multiresistente aos antimicrobianos utilizados nesse experimento. E cepa de SE como bactéria receptora proveniente da bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia do Departamento de Clínica Veterinária da FMVZ - UNESP *Campus* de Botucatu.

3.3. Teste de resistência a antimicrobianos

O teste de inibição em placa (antibiograma) foi realizado seguindo a metodologia de Bauer e Kirby (1966), com a incubação de cinco colônias da cepa de SE em caldo Mueller-Hinton (MH) à temperatura de 37°C durante duas a oito horas, até atingir a turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland. Após o ajustamento da turbidez utilizou-se suabe estéril pressionando-o contra a parede do tubo, a fim de retirar-se o excesso de líquido e em seguida semeou-se sobre a superfície da placa de Petri contendo ágar MH, girando-a duas ou mais vezes. Fechada a placa, esta foi deixada em repouso por cinco minutos, para completa absorção do excesso de umidade. Depositaram-se sete discos (Sensifar) impregnados com antimicrobianos, distantes entre si sobre a superfície de cada placa com auxílio de pinça estéril. Posteriormente a placa foi invertida e incubada a 37°C em aerobiose. A leitura das placas foi realizada após 18 horas de incubação e, com auxílio de régua foi medido o diâmetro dos halos de inibição incluindo os discos. Os resultados foram analisados comparando com tabela padrão de sensibilidade da Sensifar - Cefar*.

Os 14 antimicrobianos utilizados no antibiograma foram gentamicina (10µg), enrofloxacin (5µg), cloranfenicol (30µg), neomicina (30µg), tetraciclina (30µg), ampicilina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), sulfonamidas (300µg), trimetoprima (5µg), ceftiofur (30µg), amicacina (30µg), estreptomicina (10µg), tobramicina (10µg) e ciprofloxacina (5µg).

3.4. Condições de crescimento bacteriano

Todas as cepas bacterianas foram semeadas em AVB e incubadas durante 24 horas a temperatura de 37°C. Posteriormente, cinco colônias de cada cepa foram semeadas em tubos contendo 3 mL de caldo nutriente. Em seguida, cada uma das cepas de SE foi submetida à variação de pH, temperatura ou concentração de nutrientes (Figura 1).

* Cefar Fármaco Diagnóstica Ltda. Pesquisas Clínico-Farmacêuticas e Produtos para Diagnósticos.

3.4.1. Concentração de nutrientes

As cepas de SE foram semeadas em caldo nutriente com pH $7,0 \pm 0,2$ e preparado nas concentrações de 0,5%, 1,0%, 2,5%, 5,0% e 10% a partir da recomendação do fabricante (13g de meio/L - OXOID¹) composto por 1g/L de extrato de carne, 2g/L de extrato de levedura, 5g/L de peptona e 5g/L de cloreto de sódio.

3.4.2. Variação de pH

As cepas bacterianas foram semeadas em tubos contendo caldo nutriente completo com o pH corrigido para 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0.

3.4.3. Variação de temperatura

As cepas bacterianas foram semeadas em tubos contendo caldo nutriente completo com pH $7,0 \pm 0,2$ à temperatura de 10°C, 25°C, 40°C, 55°C e 70°C.

Todos os cultivos foram realizados em triplicata e incubados durante 24 horas a temperatura de 37°C, com exceção daqueles submetidos às temperaturas diferentes. Após o período de incubação os cultivos foram avaliados em relação ao crescimento das cepas de SE, verificado por meio da turvação do meio de cultura e subsequente semeadura em AVB. Três tubos contendo caldo nutriente completo, pH $7,0 \pm 0,2$ semeados com cepa de SE e incubados a 37°C durante 24 horas e, três tubos contendo o mesmo meio e não semeados, constituíram-se respectivamente nos controles positivo e negativo.

¹ OXOID – OXOID LTD., Basingstoke, Hampshire, England.

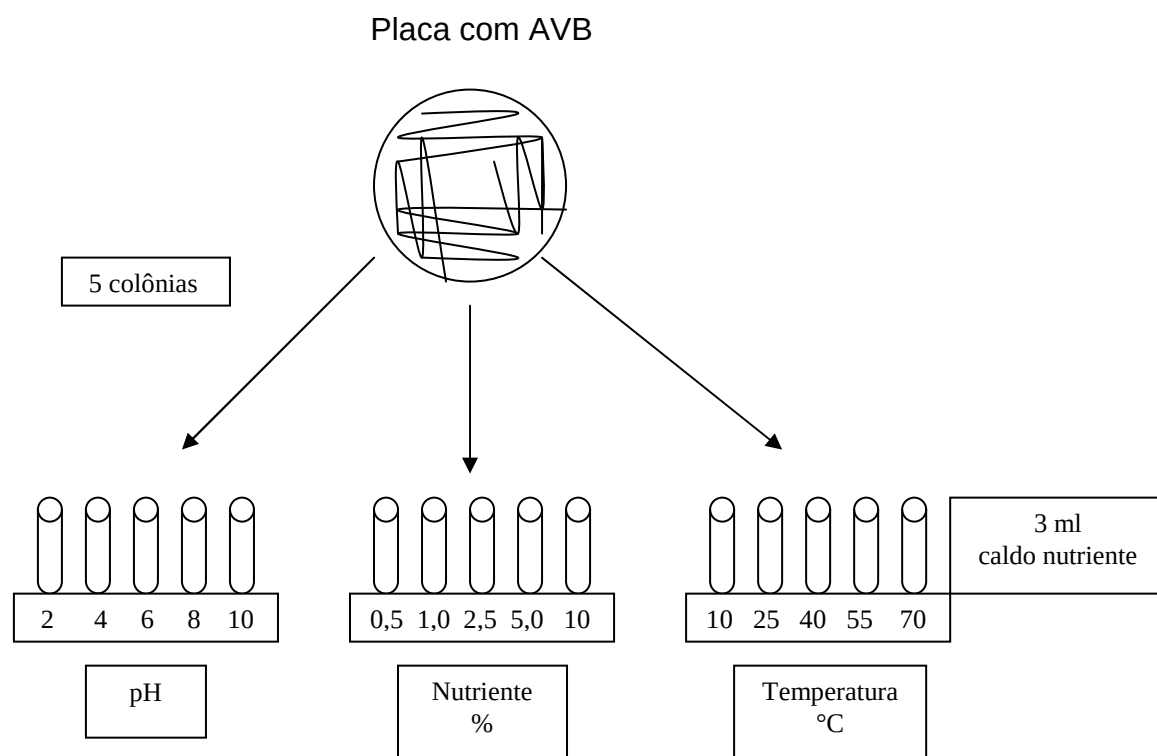


FIGURA 1. Delineamento experimental demonstrando o cultivo das cepas de *Salmonella* Enteritidis em meio com variação de pH, concentração de nutrientes e temperatura.

3.5. Biologia molecular

3.5.1. Preparação do lisado bacteriano

O lisado bacteriano foi obtido de cada cepa para detecção dos genes de virulência e resistência a antimicrobianos. Após cultivo da bactéria por 24 horas a 37°C em AVB, colônias foram transferidas para tubo de ensaio contendo água bidestilada estéril, até atingir a turbidez equivalente a 3 na escala de MacFarland e centrifugado a 15.000 rpm durante 5 minutos. Em seguida, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de água bidestilada estéril, submetendo-se esta suspensão a 100°C durante 10 minutos e após refrigeração (4°C) centrifugou-se a 15.000 rpm, sendo o sobrenadante armazenado a -20°C até o momento de uso (ÁLVAREZ *et al.*, 2003).

3.5.2. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos (primers) utilizados para o gene que integra a classe 1 - *integrons* (ÁLVAREZ *et al.*, 2003; BIRNBOIM & DOLY, 1979; GOLDSTEIN *et al.*, 2001) e genes de virulência - *invA* e *spvC* (SWAMY *et al.*, 1996) estão especificados na Tabela 1.

TABELA 1. Oligonucleotídeos (primers) referentes aos genes de resistência a antimicrobianos (*integrons*) e de virulência (*InvA* e *SpvC*) de *Salmonella* Enteritidis.

Gene	Oligonucleotídeo (5' → 3')	Pares de bases (pb)
<i>Integrons</i> classe 1	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	900
<i>InvA</i>	TTGTTACGGCTATTTTGACCA CTGACTGCTACCTTGCTGATG	521
<i>SpvC</i>	CGGAAATACCATCTACAAATA CCCAAACCCATACTTACTCTG	669

3.5.3. Amplificação do DNA bacteriano

Após a obtenção do lisado das cepas de SE, a presença dos genes foi investigada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada separadamente para cada gene (*integrons*, *invA* e *spvC*).

Para o gene de resistência antimicrobiana (*integron* classe 1) a amplificação ocorreu em microtubo estéril, onde foram adicionados tampão para PCR 1 X (100mM Tris-HCl pH 8,8 a 25°C, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂), 1µM de cada um dos oligonucleotídeos, 1U de DNA Taq polimerase, 0,2mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 13µL de água ultrapura e 15µL do lisado de cada cepa, totalizando volume final de 50µL (SILVA *et al.*, 2007).

A amplificação consistiu de desnaturação a 94°C durante 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C durante 1 minuto, anelamento a 54°C durante 1 minuto e extensão das fitas de DNA a 72°C durante 2 minutos, com extensão final a 72°C durante 10 minutos (SILVA *et al.*, 2007).

Para os genes de virulência (*invA* e *spvC*) a amplificação foi realizada em microtubo estéril, adicionando-se 2µL do DNA de cada cepa de SE, 15,55µL de água ultra pura, 2,5µL de tampão de PCR 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,3, 500mM KCl, 1,5mM MgCl₂), 0,75µL de MgCl₂ (50mM), 0,5µL de cada dNTP a 2,5mM, 1µL de cada primer (20pmoles), 0,2µL de DNA Taq polimerase (5U/µL), totalizando volume de 25µL. Iniciou-se a amplificação com desnaturação de 94°C durante 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, anelamento de 60°C durante 30 segundos e uma extensão de 72°C durante 30 segundos, seguida por extensão final de 4 minutos a 72°C.

3.5.4. Detecção do produto amplificado (eletroforese em gel de agarose)

Para cada 7µL do produto da PCR adicionaram-se 3µL de tampão de corrida (loading buffer 6X). Após homogeneização foram colocados 10µL em cada poço do gel de agarose a 1%. Os produtos da PCR juntamente com o marcador de peso molecular (100 pb DNA *ladder*) e os controles negativo e positivo, foram separados por eletroforese em corrida de 100 V durante 50 minutos. O gel foi corado com solução de brometo de etídeo (10mg/mL) durante 10 minutos e analisado sob luz ultravioleta.

3.6. Transferência horizontal de gene

Para a escolha das bactérias doadora e receptora (item 3.2.), realizou-se teste de antibiograma e PCR antes do início do experimento, para se comprovar além da resistência e sensibilidade, também a presença ou não do gene de resistência a antimicrobianos.

Até o presente momento, não se tem conhecimento na literatura da transferência horizontal de gene entre uma *Escherichia coli* e uma *Salmonella* Enteritidis, *in vitro*.

Adaptou-se a técnica utilizada por Hall e colaboradores (1993), acrescentando-se tetraciclina, ampicilina e trimetoprima na concentração de 5µg/mL ao caldo e ao ágar nutriente e 100µg/mL ao AVB. Esses antimicrobianos foram escolhidos aleatoriamente dentre aqueles em que a cepa de SE (receptora) mostrou-se sensível e a cepa de *Escherichia coli* (doadora) resistente (Figura 2).

Verificou-se a transferência com incubação das bactérias (doadora e receptora) separadamente em caldo nutriente a 37°C durante 24 horas, sendo posteriormente diluídas 100 vezes também em caldo nutriente pré-aquecido a 37°C e incubadas durante mais 4 horas. Em seguida foram centrifugadas a 7.300 rpm e o sedimento de cada bactéria (doadora e receptora) foi homogeneizado num mesmo tubo contendo 2 mL de caldo nutriente, semeado em ágar nutriente e incubados a 37°C durante 24 horas. A placa foi então lavada com PBS e semeado por esgotamento em AVB com auxílio de alça de platina. As colônias de SE e *E. coli* foram diferenciadas quanto a capacidade de fermentação da lactose presente no meio AVB (Figura 3). Separadas, as bactérias foram submetidas a novo antibiograma e detecção do gene *integron* pela PCR.

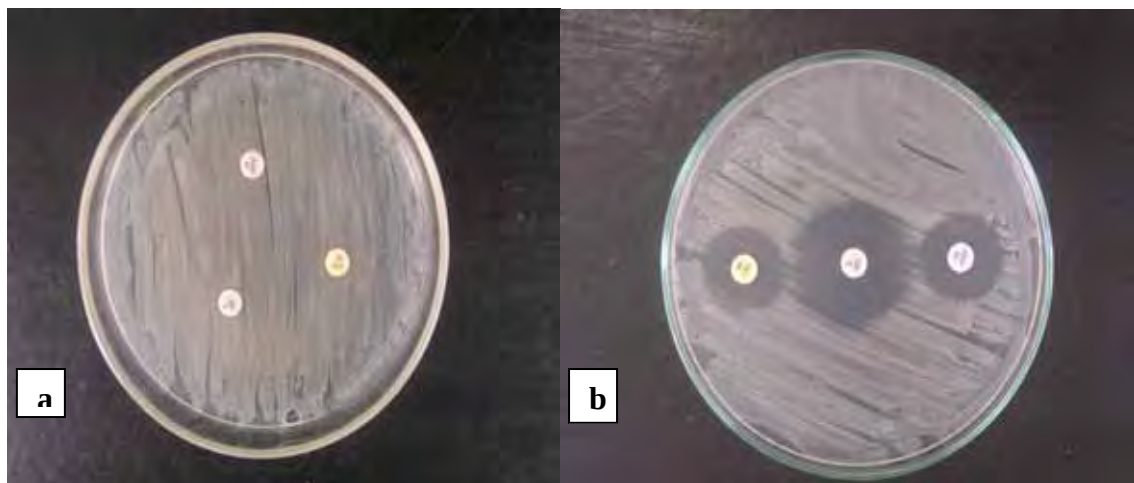


FIGURA 2. Antibiograma: a) *Escherichia coli* (doadora) resistente e b) *Salmonella* Enteritidis (receptora) sensível à tetraciclina, ampicilina e trimetoprima.



FIGURA 3. Placa de Petri contendo ágar verde brilhante semeada com lavado proveniente das cepas de *Salmonella* Enteritidis: colônias rosadas, lactose - e *Escherichia coli*: colônias amareladas, lactose +.

“A imaginação é mais importante que o conhecimento”

Albert Einstein

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Biologia molecular - Detecção do produto amplificado

A PCR foi realizada com as 100 cepas de SE pesquisadas. Na eletroforese em gel de agarose observou-se a presença de bandas específicas referentes aos pesos moleculares dos genes *invA*-521 pb e *spvC*-669 pb (Figura 4).

Na pesquisa dos genes de virulência *invA* e *spvC* das cepas de SE apenas 3% e 26%, respectivamente, não apresentaram os genes.

O gene de resistência aos antimicrobianos (*integron* classe 1), não foi observado em nenhuma das 100 cepas de SE pesquisadas na PCR.

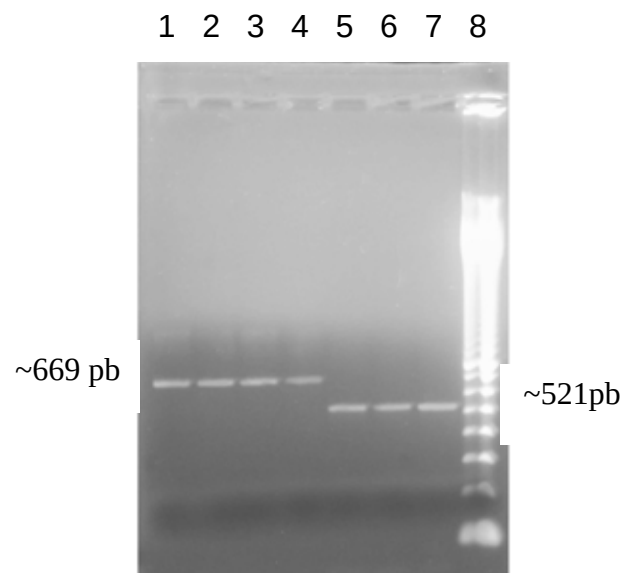


FIGURA 4. Genes de virulência *spvC* (colunas 1, 2, 3 e 4) e *invA* (colunas 5, 6 e 7). Marcador de peso molecular 100 pb DNA *ladder* (coluna 8).

4.2. Condições de crescimento bacteriano

4.2.1. Concentração de nutrientes

Em relação à quantidade de nutrientes, somente 11 cepas de SE foram capazes de crescer quando o meio de cultivo estava com apenas 0,5% da quantidade recomendada pelo fabricante (OXOID®), sendo todas positivas quanto à presença dos genes de virulência pesquisados. Nas demais concentrações de nutrientes todas as cepas cresceram independentemente da presença dos genes de virulência pesquisados (Anexo I e Tabela 2).

TABELA 2. Presença dos genes de virulência *spvC* e *invA* em *Salmonella* Enteritidis e sua multiplicação em diferentes concentrações de nutrientes.

		Concentração de nutrientes (%)										
Gene	PCR	0,5		1,0		2,5		5,0		10,0		Total
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
SpvC	+	11	63	74	0	74	0	74	0	74	0	74
	-	0	26	26	0	26	0	26	0	26	0	26
InvA	+	11	86	97	0	97	0	97	0	97	0	97
	-	0	3	3	0	3	0	3	0	3	0	3

4.2.2. Variação de pH

Nenhuma das cepas testadas cresceu no cultivo com pH 2,0, demonstrando a incapacidade da SE crescer em meios muito ácidos. Nos cultivos com pH 4,0 houve o crescimento de apenas duas cepas de SE, assim como quando o pH foi de 10,0, porém elas não foram as mesmas. Em ambos os casos os genes *spvC* e *invA* estavam presentes nas quatro cepas, demonstrando uma possível expressão destes genes de virulência na bactéria. Já nos cultivos com pH 6,0 e 8,0 todas as cepas cresceram, independente de possuir ou não os genes (Anexo II e Tabela 3).

TABELA 3. Presença dos genes de virulência *spvC* e *invA* em *Salmonella* Enteritidis e sua multiplicação em diferentes níveis de pH.

		pH										Total
Gene	PCR	2,0		4,0		6,0		8,0		10,0		
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
<i>SpvC</i>	+	0	74	2	72	74	0	74	0	2	72	74
	-	0	26	0	26	26	0	26	0	0	26	26
<i>InvA</i>	+	0	97	2	95	97	0	97	0	2	95	97
	-	0	3	0	3	3	0	3	0	0	3	3

4.2.3. Variação de temperatura

Considerando as diferentes temperaturas de cultivo, houve crescimento somente de quatro cepas de SE na temperatura de 25°C, as quais também apresentaram os genes *spvC* e *invA*. Na temperatura de 40°C todas as cepas cresceram satisfatoriamente, independente de apresentar ou não os genes de virulência. Nas demais temperaturas (10°C, 55°C e 70°C), não houve crescimento de nenhuma das cepas de SE (Anexo III e Tabela 4).

TABELA 4. Presença dos genes de virulência *spvC* e *invA* em *Salmonella* Enteritidis e sua multiplicação em diferentes temperaturas de cultivo.

Temperatura (°C)												
Gene	PCR	10		25		40		55		70		Total
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
SpvC	+	0	74	4	70	74	0	0	74	0	74	74
	-	0	26	0	26	26	0	0	26	0	26	26
InvA	+	0	97	4	93	97	0	0	97	0	97	97
	-	0	3	0	3	3	0	0	3	0	3	3

As cepas de SE que apresentaram crescimento quando submetidas à concentração de 0,5% de nutrientes, pH 4,0 ou 10,0 e temperatura de 25°C, como apresentadas nas figuras 5, 6 e 7, respectivamente, também apresentaram os genes de virulência *invA* e *spvC*.

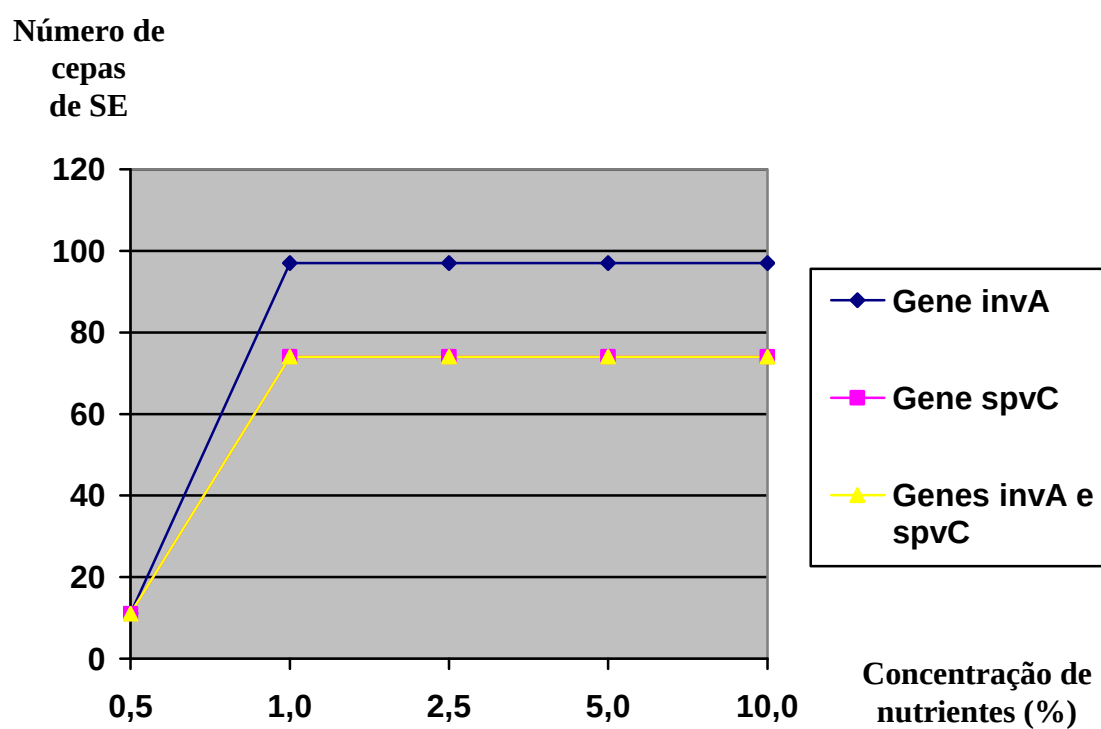


FIGURA 5. Número de cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) portadoras dos genes de virulência *invA* e *spvC* em diferentes concentrações de nutrientes.

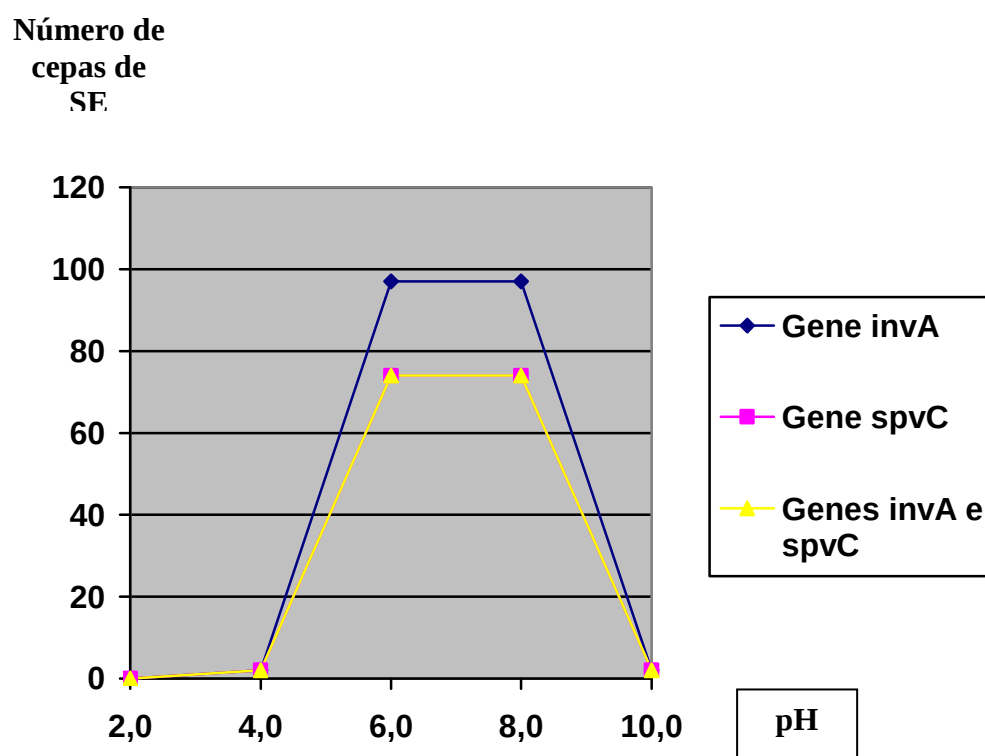


FIGURA 6. Número de cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) portadoras dos genes de virulência *invA* e *spvC* em diferentes níveis de pH.

Número de
cepas
de SE

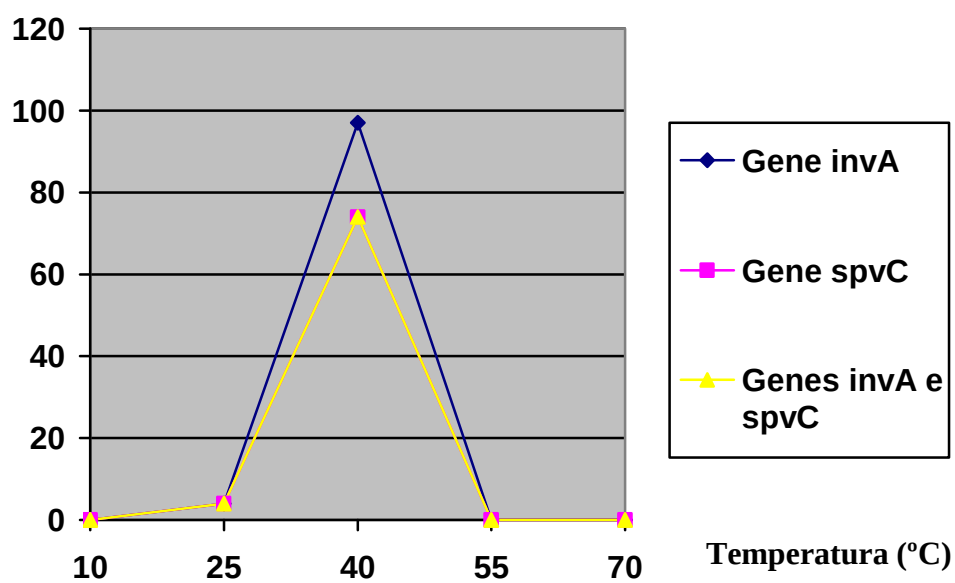


FIGURA 7. Número de cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) portadoras dos genes de virulência *invA* e *spvC* em diferentes temperaturas de cultivo.

Todas as cepas que se multiplicaram fora das condições ideais para *Salmonella* spp. apresentaram ambos os genes de virulência pesquisados.

4.3. Teste de resistência a antimicrobianos

Os resultados da resistência e sensibilidade das 100 cepas de SE isoladas de material avícola frente a antimicrobianos estão demonstrados na Tabela 5.

TABELA 5. Perfil de resistência e sensibilidade de 100 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de material avícola.

Antimicrobianos	Número de cepas		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Sulfonamida	75	14	11
Ácido nalidíxico	57	16	27
Ampicilina	41	7	52
Tetraciclina	18	4	78
Tobramicina	16	2	82
Enrofloxacina	14	30	56
Gentamicina	10	3	87
Neomicina	9	30	61
Ceftiofur	9	12	79
Estreptomicina	7	10	83
Trimetoprima	5	9	86
Amicacina	4	1	95
Ciprofloxacina	1	5	94
Cloranfenicol	0	1	99

O antimicrobiano que se mostrou mais eficaz foi o cloranfenicol, apresentando 99% de sensibilidade nas cepas testadas.

O antimicrobiano de menor inibição das cepas (11%) foi a sulfonamida.

Apenas oito cepas de SE apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Setenta e duas cepas de SE foram resistentes de um a três antimicrobianos, 15 cepas foram resistentes de quatro a seis antimicrobianos e cinco cepas foram resistentes a mais de sete antimicrobianos, sendo que uma dessas foi resistente a até nove dos 14 antimicrobianos testados (Figura 8).

Número de
cepas
resistentes

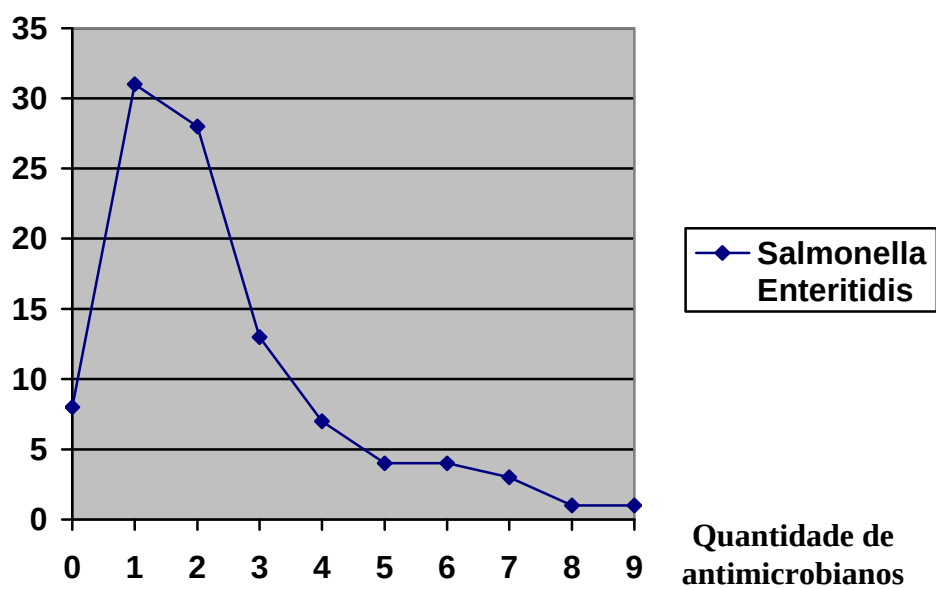


FIGURA 8. Número de cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de material avícola resistentes a antimicrobianos.

4.4. Detecção de gene de resistência a antimicrobianos

O gene de resistência a antimicrobianos (*integron* classe 1) não foi observado em nenhuma das 100 cepas de SE pesquisadas na PCR.

4.5. Transferência horizontal de genes

Após realização da técnica modificada de transferência de gene *in vitro* proposta por Hall e colaboradores (1993), as bactérias foram separadas e submetidas a novo antibiograma, quando ambas apresentaram-se resistentes à tetraciclina, ampicilina e trimetoprima (Figura 9). A presença do gene de resistência a antimicrobianos (*integron* classe 1) foi verificada tanto na *E. coli* (doadora) quanto na SE (receptora), confirmando assim a transferência deste gene entre ambas (Figura 10).

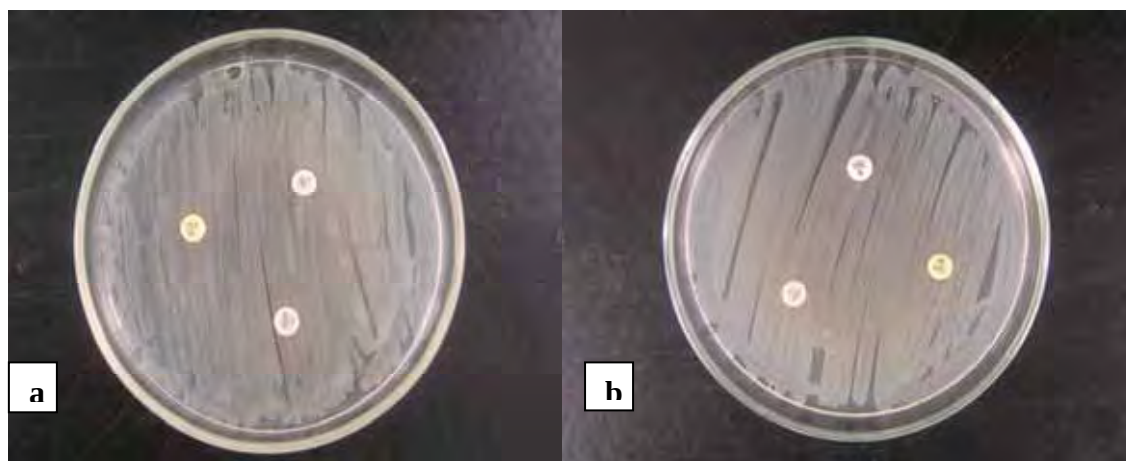


FIGURA 9. Antibiograma mostrando a) *Salmonella* Enteritidis (receptora) e b) *Escherichia coli* (doadora) resistentes à tetraciclina, ampicilina e trimetoprima.

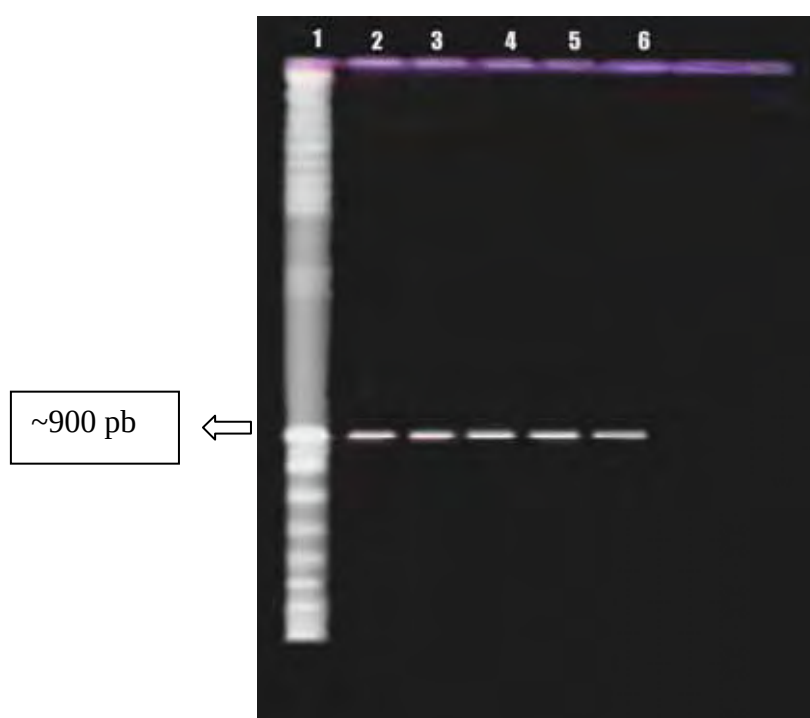


FIGURA 10. Gel de agarose mostrando as bandas do gene de resistência antimicrobiana (*integron* classe 1). Na coluna 1 o marcador de peso molecular, na coluna 2 o controle positivo *Escherichia coli* (doadora) e nas colunas 3, 4, 5 e 6 cepas de *Salmonella* Enteritidis receptoras positivas.

*“Aprendi que maturidade tem mais a ver
com os tipos de experiência que se teve
e o que você aprendeu com elas do que
com quantos aniversários você celebrou”*

William Shakespeare

Discussão

5. DISCUSSÃO

Todas as cepas negativas para o gene *invA* (3%) também foram negativas para o gene *spvC* e só cresceram na temperatura de 37°C, pH 6,0 e 8,0 e com concentração de nutriente recomendada pelo fabricante (OXOID®), concordando com experimento desenvolvido por FRANCO & LANDGRAF (1996) e SILVA (1999).

A incapacidade da SE em crescer nos meios com pH muito baixo (ácido), também foi demonstrado nesse experimento, quando nenhuma das cepas testadas conseguiu crescer em pH 2,0.

Duas cepas de SE que cresceram em meio de cultivo com pH 4,0 e outras duas em pH 10,0, apresentaram os genes de virulência *invA* e *spvC*, possivelmente expressos nessas cepas por crescerem em condições hostis de pH.

O crescimento de todas as cepas de SE no meio de cultura com pH 6,0 e 8,0 já era esperado, devido ao fato de que o pH ideal para o crescimento da SE estar entre 6,5 e 7,5, conforme SILVA (1999).

O crescimento de todas as cepas na temperatura de 40°C e o não crescimento nas temperaturas de 10°C, 55°C e 70°C, concorda com experimento desenvolvido por FRANCO & LANDGRAF (1996), quando observaram que entre 35°C a 37°C seria a temperatura ideal para crescimento de *Salmonella* spp., sendo 5°C e 47°C as temperaturas mínima e máxima de crescimento, respectivamente.

De todas as cepas que cresceram fora das condições ideais de temperatura, pH e concentração de nutriente para *Salmonella* spp., apresentando os genes de virulência (*invA* e *spvC*), apenas duas apresentaram crescimento concomitante tanto em pH 10,0, quanto na temperatura de 25°C, demonstrando assim uma possível capacidade de sobrevivência em condições

hostis quando os genes de virulência estão presentes e são expressados. Estes resultados não comprovam inteiramente a relação de sobrevivência da SE em condições hostis com a presença dos genes de virulência testados, embora não deixe dúvidas em relação à presença dos dois genes testados nessas duas cepas de SE. Segundo Valone e colaboradores (1993), a capacidade das bactérias em sobreviver em condições impróprias de cultivo está relacionada com a presença e expressão destes genes de virulência.

Nem todas as bactérias que possuem genes de virulência são capazes de expressá-los. Porém, quando expressados podem ser fundamentais na sua multiplicação e sobrevivência, ampliando a preocupação em relação tanto da saúde pública quanto animal.

O antimicrobiano mais eficaz contra SE observado neste experimento foi o cloranfenicol. Resultados semelhantes também foram observados por Cunha e colaboradores (1981), quando demonstraram a sensibilidade de 100% de cepas de *S. Typhi* a este antimicrobiano em diferentes estados brasileiros. Por outro lado, alguns trabalhos evidenciam a resistência de *Salmonella* spp. a este antimicrobiano desde a década de 60 em muitos países, incluindo o Brasil (SOLÓRZANO-SANTOS *et al.*, 1987; ASENSI *et al.*, 1994). A sensibilidade da bactéria ao cloranfenicol possivelmente se deve ao fato deste antimicrobiano ter sido proibido para uso na alimentação animal desde 2003 (BRASIL, 2003), reduzindo assim a exposição das bactérias a este fármaco.

A resistência da maioria das cepas de *Salmonella* testadas neste e em outros trabalhos frente à sulfonamida, ocorre possivelmente devido a este antimicrobiano ser utilizado em larga escala tanto na medicina humana quanto veterinária há muito tempo (NOGUEIRA *et al.*, 2005).

O uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos, tanto em seres humanos quanto em animais, tem sido um problema em diversos países, já que a pressão seletiva destas drogas sobre bactérias de interesse veterinário

também influencia o perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas ao homem, especialmente pela transferência de plasmídios, um dos principais responsáveis pelo mecanismo de resistência (ALECRIM *et al.*, 2002).

Outros genes ou mecanismos devem estar relacionados com a multiresistência bacteriana aos antimicrobianos, já que várias cepas foram multiresistentes (mais de três antimicrobianos) e em nenhuma destas foi detectado o gene de resistência a antimicrobianos *integron* classe 1.

Com o uso indevido de antimicrobianos, encontramos grande quantidade de SE (80%) apresentando resistência a até três antimicrobianos.

Para confirmar que houve a transferência do gene entre as bactérias e não a resistência adquirida pela SE por meio da pressão exercida pelo uso de subdoses dos antimicrobianos (5µg/mL) acrescidos ao meio de cultivo, realizou-se o mesmo procedimento de transferência horizontal do gene, mas sem a presença da bactéria doadora (*E. coli*), utilizando somente a bactéria receptora (*Salmonella* Enteritidis) a qual não apresentou o gene.

A transferência do gene de resistência a antimicrobianos foi facilmente realizada, concordando com Uetanabaro e Góes-Neto (2006) quando descrevem a facilidade de transferência desses genes, favorecida pela cooperação entre os diferentes elementos de transferência genética.

A transferência do gene de resistência presente em *integron* classe 1 observada nesse experimento, concorda com Nwosu (2001), quando descreve que a transferência horizontal de genes é favorecida pela presença de elementos genéticos móveis (plasmídios, transposons, integrons, cassetes de genes e bacteriófagos) e pela organização do genoma bacteriano em operons, o que permite a transferência cooperativa de genes com funções relacionadas.

A transferência horizontal de gene observada nesse experimento por conjugação, assim como experimento realizado por Nógrády e

colaboradores (2006), sugerem que muitas dessas enterobactérias podem ser um potencial reservatório para disseminação de genes de resistência a antimicrobianos e para emergência de novas bactérias patogênicas e multiresistentes a antimicrobianos em aves.

*“O que adoro em tua natureza,
não é o profundo instinto maternal
em teu flanco aberto como uma ferida
nem a tua pureza, nem a tua impureza.
O que adoro em ti, é a Vida”*

Manuel Bandeira

Conclusão

6. CONCLUSÃO

Salmonella Enteritidis apresenta genes relacionados com virulência (*invA* e *spvC*), que podem não ter sido expressos.

As Cepas de *Salmonella* Enteritidis podem apresentar pouca exigência nutricional, sendo mais evidentes em relação à temperatura e pH.

Com relação a pouca exigência nutricional da *Salmonella* Enteritidis, podemos concluir que esta bactéria pode se multiplicar em diversos substratos e em diferentes alimentos, se tornando um problema muito grande em saúde pública, e também na economia avícola, com prejuízos em relação à transmissão dessa bactéria para as próprias aves dentro de uma granja.

A multiresistência não teve relação com a presença do gene de resistência a antimicrobianos (*integron* classe 1), pois nenhuma das cepas apresentou tal gene.

A transferência do gene de resistência a antimicrobianos *integron* classe 1 pode ser realizada *in vitro*, por meio do cultivo concomitante de SE (receptora) e *E.coli* (doadora).

*“Se procurar bem você acaba encontrando
não a explicação duvidosa da vida,
mas a poesia inexplicável da vida”*

Carlos Drummond de Andrade

Bibliografias

7. BIBLIOGRAFIAS

- ABIGAIL, A. S.; DIXIE, D. W. *Vibrio Cholerae* the cause of cholera and *Salmonella* species. **Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach**. 2^a ed. ASM Press. Washington dc. 2002.
- ABSHIRE, K. Z., F. C. NEIDHARDT. Analysis of proteins synthesized by *Salmonella typhimurium* during growth within a host macrophage. **Journal of Bacteriology**. v. 175, p. 3734-3743, 1993.
- ALECRIM, W. D.; LOUREIRO, A. C. S. P.; MORAES, R. S.; MONTE, R. L.; LACERDA, M. V. G. Febre tifóide: recaída por resistência antimicrobiana. Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35 . n. 6. 2002.
- ÁLVAREZ, F. M.; RODRÍGUES, S. T.; BREY, F. E.; LÓPEZ, M. C.; PIÑEIRO, L. Asociación entre integrones de clase 1 com resistência a multiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*. **Revista Española de Quimioterapia** v. 16, nº4, p. 394-397, 2003.
- AMABILE-CUEVAS, C. F.; CHICUREL, M. E. Bacterial plasmids and gene flux. **Cellular**. v. 70. p. 189-199. 1992.
- ASENSI M. D., HOFER E. Serovars and multiple drug resistant *Salmonella* sp isolated from children in Rio de Janeiro – Brazil. **Revista de Microbiologia de São Paulo** 25: 149-153, 1994.
- BARROW, P. A. Immunity to *Salmonella* and other bacteria. In: DAVISON, T. F.; MORRIS, T. R.; PAYNE, L. N. **Poultry Immunology**. Berkshire: Carfax Publishing Company, v. 24, p. 243-263, 1995.
- BARROW, P. A. The paratyphoid salmonellae. **Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties**. V. 19; p. 351-375, 2000.

- BARROW, P. A.; LOVELL, M. A. Functional homology of virulence plasmids in *Salmonella gallinarum*, *S. pullorum* and *S. typhimurium*. **Infection and Immunity** v. 57. p. 3136-3141. 1989.
- BAUER, A. W., KIRBY, W. M. N. Antibiotic susceptibility testing by standardized simple disc method. **American Journal Clinical Pathology**, n. 45, p. 492 – 496, 1966.
- BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**. v. 7, p. 1513-1523, 1979.
- BORLAND, E. D. *Salmonella* infection in poultry. **The Veterinary Records**, v. 97, p. 406-408, 1975.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – Instrução Normativa nº9, de 27 de junho de 2003. **Diário Oficial da União**. Seção 1. nº 123. publicado em: 30 de junho de 2003. p. 4, 2003.
- BRYAN, F. L.; DOYLE, M. P.; Health Risks and Consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in Raw Poultry. **Journal of Food Protection**, v. 58, n. 3, p. 326-344, 1995.
- BUCHMEIER, N. A., AND F. HEFFRON. Induction of *Salmonella* stress proteins upon infection of macrophages. **Science** v. 248, p. 730-732, 1990.
- BURNS-KELIHER, L., C. A. NICKERSON, B. J. MORROW, AND R. CURTISS, III. Cell-specific proteins synthesized by *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**. v. 66, p. 856-861, 1998.

- COHENS, N.; CHANG, A. C. Y.; HSU, L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. (USA) v. 69. p. 2110-2114. 1972.
- COURVALIN, P. Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1447-1451, 1994.
- CUNHA M. A. S, SUASSUNA I. R, SUASSUNA I. Sensibilidade de *Salmonella typhi* a antimicrobianos em emprego clínico. **Revista da Associação Médica Brasileira** v. 27 .p. 267-268, 1981.
- DANBARA, H.; MORIGUCHI, R.; SUZUKI, S.; TAMURA, Y.; KIJIMA, M.; OISHI, K.; MATSUI, H.; ABE, A.; NAKAMURA, M. Effect of 50 kilobase-plasmid, pKDSC50, of *Salmonella choleraesuis* RF-1 strain on pig septicemia. **J. Vet. Med. Sci.** v. 54, p. 1175-1178, 1992.
- DE CHAMPS, C.; SIROT, C.; CHANAL, C.; POUPART, M. C.; DUMAS, M. P.; DUMAS, J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum β -lactamase among different Enterobacteriaceae isolated in a French hospital. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 27, p. 441-457, 1991.
- DRÖGE, M.; PÜHLER, A.; SELBITSCHKA, W. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: A natural phenomenon of public concern. **Journal of Biotechnology**, v. 64, p. 75-90, 1998.
- EDENS, F.W. An alternative for antibiotic se in poultry: probiotics. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, n.2, p.75-97. 2003.
- FORTUNA, J.L; FRANCO, R.M. Pequeno Dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como causadora de infecções alimentares. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19 (128) p. 33-44, 2005.

- FRANCISCO, D.C., NASCIMENTO, V.P., LOGUERCIO, A.P., CAMARGO, L.
Caracterização do consumidor de carne de frango em Porto Alegre. **Ciência Rural**, v. 37(1), p. 253-258, 2007.
- FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microrganismos patogênicos de importância em alimentos**. In: FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo. Ed. Atheneu, p. 182. 1996.
- GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C.; COSTEAS. Molecular and Functional Characterization of the *Salmonella* Invasion Gene *invA*: Homology of INVA to Members of a New Protein Family. **Journal of Bacteriology**, v. 174, nº13, p. 4338-4349, 1992.
- GALÁN, J. E.; CURTISS III, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proceedings of National Academy of Science from USA**, v. 86, p. 6383-6387, 1989.
- GAST, R. K. Paratyphoid Infections. In: Calnek, B. W.(Ed.) **Diseases of poultry**. 10 ed. Ames: Iowa State University Press, p.81-121, 1997.
- GAST, R. K.; MITCHELL, B. W.; HOLT, P. S. Airbone transmission of *Salmonella enteritidis* infection between groups of chicks in controlled-environment isolation cabinets. **Avian Diseases**, v. 42, n. 2, p. 315-320, 1998.
- GINOCCHIO, C.; OLMSTED, S. B.; GALAN, J. E. Contact with Epithelial Induces the Formation of Surface Appendages on *Salmonella Typhimurium*. **Cellular**, v. 76, p. 717-724, 1994.

- GOLDSTEIN, C.; LEE, M. D.; SANCHEZ, S.; HUDSON, C.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B.; GRADY, M.; LIEBERT, C.; SUMMERS, A. O.; WHITE, D. G.; MAURER, J. J. Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, nº 3. p. 723-726. 2001.
- GÓMEZ, L. R. Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. **International Microbiology**. v. 1, p. 279-284, 1998.
- GONZÁLEZ, G. R.; MELLA, S. M.; ZEMELMAN, R. Z.; BELLO, H. T.; DOMÍNGUEZ, M. Y. Integrones y cassettes genéticos de resistencia: estructura y rol frente a los antibacterianos. **Revista Médica del Chile**. v. 132. n. 5. Santiago. p. 619-626. 2004.
- GONZÁLEZ, G. R.; SOSSA, K.; MELLA, S. M.; ZEMELMAN, R. Z.; BELLO, H. T.; DOMÍNGUEZ, M. Y. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. **FEMS Microbiology Letters**. v. 161. p. 125-128. 1998.
- GUILLOTEAU, L. A.; WALLIS, T. S.; GAUTIER, A. V.; MacINTYRE, S.; PLATT, D. J.; LAX, A. J. The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella* induced lysis of macrophages and influences inflammatory responses. **Infection and Immunity**, v. 68, nº 8, p. 3385-3393, 1996.
- GUINEY, D. G.; LIBBY, S.; FANG, F. C.; KRAUSE, M.; FIERER, J. Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. **Trends in Microbiology**. v. 3, nº 7, p. 275-279, 1995.
- GULIG, P. A.; CURTISS III, R. Plasmid-Associated Virulence of *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 55, nº 12, p. 2891-2901, 1987.

- GULIG, P. A.; DANBARA, H.; GUINEY, D. G.; LAX, A. J.; NOREL, F.; RHEN, M. Molecular analysis of *spv* virulence genes of the salmonella virulence plasmids. **Molecular Microbiology**, v. 7, nº6, p. 825-830, 1993.
- GUTIÉRREZ, C. L.; MONTIEL, V. E.; AGUILERA, P. P.; GONZÁLEZ, A. M. C. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. **Salud Pública de México**; v. 42. p. 490-495. 2000.
- HACKER, J.; BLUM-OEHLER, G.; MÜHLDORFER, I.; TSCHÄPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 6, p. 1089-1097, 1997.
- HALL, L. M. C.; LIVERMORE, D. M.; GUR, D.; AKOVA, M.; AKALIN, H. E. OXA-11, an Extended-Spectrum Variant of OXA-10 (PSE-2) β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, nº8, p. 1637-1644, 1993.
- HARDY, C. M.; CLARK-WALKER, G. D.; Nucleotide sequence of the COX1 gene in *Kluyveromyces lactis* mitochondrial DNA: evidence for recent horizontal transfer of a group II intron. **Current Genetics**, v. 20, p. 99-114, 1991.
- HEFFERNAN, E. J.; FIERER, J.; CHIKAMI, G.; GUINEY, D. Natural History of Oral *Salmonella Dublin* Infection in BALB/c Mice: Effect of a 80-kilobase-pair Plasmid on Virulence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, nº 6, p. 1987.
- HELDBERG, C. W.; DAVID, M. J.; WHITE, K. E.; MACDONALD, K. L.; OSTERHOLM, M. T. Role of Egg Consumption in Sporadic *Salmonella* enteritidis and *Salmonella typhimurium* Infections in Minnesota. **The Journal of Infection Diseases**, v. 167, p. 107-111, 1993.

- HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 21-27, 1998.
- HOLMES, B.; GROSS, R.J. Coliform bacteria: various other members of the Enterobacteriaceo. In: PARKER, M.T.; COLLIER, L.H. (Ed). **Topley & Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity**. 8 ed. London: Eduard Arnold. v.2, p.415-441,1990.
- HOLMGREN, A.; BRÄNDEN, C. I. Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. **Nature**, v.342, p. 248-251, 1989.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's: manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 186-187, 1994.
- HOWARD, B. J.; KLASS II, J.; RUBIN, S. J.; WEISSFELD, A. S.; TILTON, R. C. Clinical and pathogenic microbiology. **The C. V. Mosby Company**. St. Louis, MO.1987.
- KLOTZ, M. G.; KLASSEN, G. R.; LOEWEN, P. C. Phylogenetic relationship among prokaryotic and eukaryotic catalases. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 951-958, 1997.
- LIBBY, S.; ADAMS, L. G.; FICHT, T. A.; ALLEN, C.; WHITFORD, H. A.; BUCHMEIER, N. A.; BOSSIE, S.; GUINEY, D. The *spv* Genes the *Salmonella dublin* Virulence Plasmid are Requerid for Severe Enteritis and systemic Infections in the Natural Host. **Infection and Immunity**, v. 65, nº 5, p. 1786-1792, 1997.

- LIBBY, S. J.; LESNICK, M.; HASEGAWA, P.; WEIDENHAMMER, E.; GUINEY, D. G. The *Salmonella* virulence plasmid *spv* genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. **Cellular Microbiology** v. 2. p. 49-58, 2000.
- MARCUS, S. L.; BRUMELL, J. H.; PFEIFER, G.; FINLAY, B. B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 145-156, 2000.
- MEHRABIAN, S., JABERI, E. Isolation, identification and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* from meat products in Tehran. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 10(11), p. 122-126, 2007.
- MEYER, A. D.; ICHIAWA, T.; MEINS JR, F. Horizontal gene transfer: regulated expression of a tobacco homologue of the *Agrobacterium rhizogenes rolC* gene. **Molecular and General Genetics**, v. 249, p. 265-273, 1995.
- MISSOTTEN, J.A.M. et al. Screening of two probiotic products for use in fermented liquid feed. **Livestock Science**, v.108, n.1-3, p.232-235, 2007.
- MORSE, D. L.; BIRHEAD, G. S.; GUARDINO, J.; KONDRACKI, S. F.; GUZEWICH, J. J. Outbreak and Sporadic Egg-Associated Cases of *Salmonella enteritidis*: New York's Experience. **American Journal of Public Health**, v. 84, p. 859-860, 1994.
- MUÑOZ, J.; GONZÁLEZ, G.; BELLO, H.; DOMÍNGUEZ, M.; MELLA, S.; ZEMELMAN, R. Prevalencia de integrones en amostras intrahospitalarias de *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. y su relación con la resistencia a antibióticos aminoglicosidos. **Anales Microbiology**. v. 3. p. 72. 2000.

- NÓGRÁDY, N.; PÁSZTI, J.; PIKÓ, H.; NAGY, B. Class 1 integrons and their conjugal transfer with and without virulence-associated genes in extra-intestinal and intestinal *Escherichia coli* of poultry. **Avian Pathology**. v. 35, n. 4, p. 349-356. 2006.
- NOGUEIRA, I. A.; BRASIL, P.; CONCEIÇÃO, M.; MARTINS, I. S. **Recomendações para o uso adequado dos antimicrobianos**. Rio de Janeiro. Capturado em: 16 dez. 2005. online. Disponível na internet: <http://www.saude.rj.gov.br/cecih/Antimicrobianos.doc>
- NOGUEIRA, M. S.; NASCIMENTO, A. M. A.; CHARTONE-SOUZA, E. Ação de produtos naturais na inibição do crescimento bacteriano e do fluxo gênico e na origem de mutantes resistentes. In: 45º Congresso Nacional de Genética, 1999, Gramado-RS. **Revista Genetics and Molecular Biology**. v. 22. p. 431, 1999.
- NWOSU, V. C. Antibiotic Resistance with particular reference to soil microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 152, p. 421-430, 2001.
- PASSARO, D. J.; REPORTER, R.; MASCOLA, L.; KILMAN, L.; MALCOM, G. B.; ROLKA, H.; WERNER, B.; VUGIA, D. J. Epidemic *Salmonella enteritidis* Infection in Los Angeles County, California. The Predominance of Phage Type 4. **West of Journal Medical**, v. 165, p. 126-130, 1996.
- PESSANHA, R. P.; GONTIJO FILHO, P. P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 53 no.1, 2001.

- PHILIPPON, A.; LABIA, R.; JACOBY, G. A. Extended-spectrum β -lactamase. . **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 33, p. 1131-1136, 1989.
- POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis In: SAEED, A. M.; GAST, R. K.; POTTER, M. E.; WALL, P. G. ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals**. Ames: Iowa State University Press. p. 3-18. 1999.
- QUINTAES, B. R.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. Marcadores epidemiológicos em *Salmonella* Enteritidis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, Rio de Janeiro, 1997. **Anais...**, p. 54, 1997.
- RAHN, K.; De GRANDIS, S. A.; CLARKE, R. C.; McEWEM, S. A.; GÁLAN, J. E.; GINOCHIO, C.; CURTISS III, R.; GYLES, C. L. Amplification of na invA sequence of *Salmonella typhimurium* by polemerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, v. 6, p. 271-279, 1992.
- RODRIGUE, D. C.; TAUXE, R. V.; ROWE, B. Internacional increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? **Epidemiology and Infection**, v. 105, p. 12-27, 1990.
- ROTGER, R.; CASADÉUS, J. The virulence plasmids of *Salmonella*. **International Microbiology**, v.2, p. 177-184, 1999.
- RYCHLIK, I.; LOVELL, M. A.; BARROW, P. A. The presence of genes homologous to the K88 genes *faeH* on the virulence plasmid of *Salmonella gallinarum*. **Microbiology Letters**, v.159, p.255-260, 1998.
- SALYERS, A. A.; AMA´BILE-CUEVAS, C. F. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination. **Antimicrobial Agents and Chemotheraphy**, v. 41, p. 2321-2325, 1997.

- SALYERS, A. A.; SHOEMAKER, N. B.; LI, L. Y.; STEVENS, A. M. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. **Microbiology Review**. v. 59. p. 579-590. 1995.
- SAMUEL, C. M., VUGIA, D.J., KOEHLER, K.M., MARCUS, R., DENNEN, V., DAMASKE, B., SHIFERAW, B., HADLER, J., HENAO, O.L., ANGULO, F.J. Consumption of risky foods among adults at high risk for severe foodborne diseases: room for improved targeted prevention messages. **Journal of Food Safety**, v. 27, p. 219–232, 2007.
- SILVA, E. N. Efeito das doenças infecciosas na qualidade de carne de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos. **Anais...** Campinas: FACTA, 2004.
- SILVA JUNIOR, E. A. **Manual de Controle Higiênico – Sanitário em Alimentos**. São Paulo. Capturado em: 16 abril 2009. online. Disponível em: http://www.sescsp.org.br/sesc/mesabrilsp/biblioteca/Manual_Manipuladores_Alimentos.doc
- SILVA, M. F.; VAZ-MOREIRA, I.; GONZALEZ-PAJUELO, M.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from na urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiology Ecology**. V.60. p. 166-176. 2007.
- SMITH, M. W.; FENG, D. F.; DOOLITTLE, R. F. Evolution by acquisition: the cases for horizontal gene transfers. **TIBS**, v. 17, p. 489-493, 1992.
- SOLÓRZANO-SANTOS F, LEAÑOS MB, GUISCAFRÉ GH. Resistência antimicrobiana actual de *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella sp* **Boletín Médico del Hospital Infantil de México** 44: 448-455, 1987.

- STOKES, H. W.; HALL, R. M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**. v. 3. p. 1669-1683. 1989.
- SWAMY, S. C.; BARNHART, H. M.; LEE, M. D.; DREESEN, D. W. Virulence Determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* Isolated from Poultry Products, Wastewater and Human Sources. **Applied Environment Microbiology**. v. 62, nº 10. p. 3768-3771, 1996.
- TAKESHI, H.; NOBUHIKO, O.; NORIKO, N.; TAKATOSHI, K. Complete DNA Sequence and comparative Analysis of the 50-Kilobase Virulence Plasmid of *Salmonella enterica* Seroovar Choleraesuis. **Infection and Immunity**. 69, 4: p. 2612-2620. 2001.
- THOMPSON, B. Bacterial antibiotic resistance and evolution. **Reason and Revelation**. v. 14. p. 61-63. 1994.
- TOOD, E.C.D. Epidemiology of the foodborne diseases: a Woldacide review. **World Health Statistics**, Geneva, v.50, p.30-50, 1997.
- TOP, E. M.; MOËNNE-LOCCOZ, Y.; PEMBROKE, T.; THOMAS, C. M. Phenotypic traits conferred by plasmids. In Thomas, C.M. (editor). **The Horizontal Gene Pool**. Harwood Academic. p. 249–285, 2000.
- UETANABARO, A. P. T.; GÓES-NETO, A. Segurança Alimentar: Transferência Horizontal de Genes e Alimentos Transgênicos. **Sitientibus**, v. 35, p. 111-124, 2006.
- VALONE, S. E.; CHIKAMI, G. K.; MÜLLER, V. L. Stress Induction of the Virulence Proteins (SpvA, B, C) from Native Plasmid pSDL2 of *Salmonella Dublin*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 2, p. 707-713, 1993.

- VÁZQUEZ, N. J.; LÓPEZ, V. Y.; SUÁREZ, G. F.; ESLAVA, C.; VERDUGO, R. A. Caracterización y clonación de los genes que expresan una enterotoxina LT en *Salmonella gallinarum*. **XVII Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura**, La Habana, Cuba. 2002.
- VÁZQUEZ-NAVARRETE, J.; CÓRDOBA, B. C.; LÓPEZ, V. Y.; MANCERA, M. A. **Identificación Del gene da la integrasa Tipo I y perfil da resistência antimicrobiana em *Salmonella Enteritidis***. Cuajimalpa. Capturado em: 24 nov. 2005. online. Disponível na internet: www.vet-uy.com/articulos/artic_micro/001/micro001.htm.
- WEGENER, H. C.; BAGER, F.; AARESTRUP, F. M. Vigilância da resistência aos antimicrobianos no homem, nos produtos alimentares e no gado na Dinamarca. **Indexed in MedLine as: Euro Surveill.** v. 3, nº 2. p. 17-19.1997.
- ZATYKAA, M.; THOMASA, C. M. Control of genes for conjugative transfer of plasmids and other mobile elements. **FEMS Microbiology Review.** v. 21. p. 291-319. 1998.

ANEXO I

TABELA 1. Presença dos genes de virulência *spvC* e *invA* em *Salmonella* Enteritidis (SE) e sua multiplicação em diferentes concentrações de nutrientes.

Número de cepa de SE	Gene		Concentração de nutrientes (%)				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	0,5	1,0	2,5	5,0	10
1	+	+	-	+	+	+	+
2	+	+	-	+	+	+	+
3	-	+	-	+	+	+	+
4	-	+	-	+	+	+	+
5	-	+	-	+	+	+	+
6	-	+	-	+	+	+	+
7	+	+	-	+	+	+	+
8	-	+	-	+	+	+	+
9	-	+	-	+	+	+	+
10	+	+	-	+	+	+	+
11	-	+	-	+	+	+	+
12	+	+	-	+	+	+	+
13	-	+	-	+	+	+	+
14	+	+	-	+	+	+	+
15	+	+	-	+	+	+	+
16	-	+	-	+	+	+	+
17	+	+	-	+	+	+	+
18	-	+	-	+	+	+	+
19	+	+	-	+	+	+	+
20	-	-	-	+	+	+	+
21	-	+	-	+	+	+	+
22	+	+	-	+	+	+	+
23	+	+	+	+	+	+	+
24	+	+	-	+	+	+	+
25	-	+	-	+	+	+	+
26	+	+	-	+	+	+	+
27	+	+	+	+	+	+	+
28	-	+	-	+	+	+	+
29	+	+	-	+	+	+	+
30	+	+	-	+	+	+	+
31	+	+	-	+	+	+	+
32	+	+	-	+	+	+	+
33	+	+	-	+	+	+	+
34	-	+	-	+	+	+	+
35	-	-	-	+	+	+	+
36	+	+	-	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+
38	-	+	-	+	+	+	+
39	+	+	-	+	+	+	+
40	+	+	-	+	+	+	+
41	+	+	-	+	+	+	+

Número de cepa de SE	Gene		Concentração de nutrientes (%)				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	0,5	1,0	2,5	5,0	10
42	+	+	-	+	+	+	+
43	+	+	-	+	+	+	+
44	+	+	-	+	+	+	+
45	+	+	-	+	+	+	+
46	+	+	+	+	+	+	+
47	-	+	-	+	+	+	+
48	+	+	-	+	+	+	+
49	+	+	-	+	+	+	+
50	+	+	-	+	+	+	+
51	+	+	-	+	+	+	+
52	+	+	-	+	+	+	+
53	+	+	-	+	+	+	+
54	+	+	-	+	+	+	+
55	+	+	-	+	+	+	+
56	+	+	-	+	+	+	+
57	+	+	-	+	+	+	+
58	-	+	-	+	+	+	+
59	+	+	-	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+	+
61	-	+	-	+	+	+	+
62	+	+	-	+	+	+	+
63	-	+	-	+	+	+	+
64	+	+	-	+	+	+	+
65	+	+	-	+	+	+	+
66	+	+	+	+	+	+	+
67	-	+	-	+	+	+	+
68	-	+	-	+	+	+	+
69	-	+	-	+	+	+	+
70	+	+	-	+	+	+	+
71	+	+	+	+	+	+	+
72	-	+	-	+	+	+	+
73	+	+	+	+	+	+	+
74	+	+	+	+	+	+	+
75	+	+	-	+	+	+	+
76	+	+	-	+	+	+	+
77	+	+	-	+	+	+	+
78	+	+	-	+	+	+	+
79	+	+	-	+	+	+	+
80	+	+	-	+	+	+	+
81	+	+	-	+	+	+	+
82	+	+	-	+	+	+	+
83	+	+	-	+	+	+	+
84	+	+	-	+	+	+	+
85	+	+	-	+	+	+	+
86	+	+	+	+	+	+	+
87	-	-	-	+	+	+	+
88	+	+	-	+	+	+	+

Número de cepa de SE	Gene		Concentração de nutrientes (%)				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	0,5	1,0	2,5	5,0	10
89	+	+	-	+	+	+	+
90	+	+	+	+	+	+	+
91	+	+	-	+	+	+	+
92	+	+	-	+	+	+	+
93	+	+	-	+	+	+	+
94	+	+	-	+	+	+	+
95	+	+	-	+	+	+	+
96	+	+	-	+	+	+	+
97	+	+	-	+	+	+	+
98	+	+	-	+	+	+	+
99	+	+	-	+	+	+	+
100	+	+	-	+	+	+	+

ANEXO II

TABELA 1. Presença dos genes de virulência *spvC* e *invA* em *Salmonella* Enteritidis (SE) e sua multiplicação em diferentes níveis de pH.

Número de cepas de SE	Gene		pH				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
1	+	+	-	-	+	+	-
2	+	+	-	-	+	+	-
3	-	+	-	-	+	+	-
4	-	+	-	-	+	+	-
5	-	+	-	-	+	+	-
6	-	+	-	-	+	+	-
7	+	+	-	-	+	+	-
8	-	+	-	-	+	+	-
9	-	+	-	-	+	+	-
10	+	+	-	-	+	+	-
11	-	+	-	-	+	+	-
12	+	+	-	-	+	+	-
13	-	+	-	-	+	+	-
14	+	+	-	-	+	+	-
15	+	+	-	-	+	+	-
16	-	+	-	-	+	+	-
17	+	+	-	-	+	+	-
18	-	+	-	-	+	+	-
19	+	+	-	-	+	+	-
20	-	-	-	-	+	+	-
21	-	+	-	-	+	+	-
22	+	+	-	-	+	+	-
23	+	+	-	-	+	+	-
24	+	+	-	-	+	+	-
25	-	+	-	-	+	+	-
26	+	+	-	-	+	+	-
27	+	+	-	-	+	+	-
28	-	+	-	-	+	+	-
29	+	+	-	-	+	+	-
30	+	+	-	-	+	+	-
31	+	+	-	-	+	+	-
32	+	+	-	-	+	+	-
33	+	+	-	-	+	+	-
34	-	+	-	-	+	+	-
35	-	-	-	-	+	+	-
36	+	+	-	-	+	+	-
37	+	+	-	-	+	+	-
38	-	+	-	-	+	+	-
39	+	+	-	-	+	+	-
40	+	+	-	-	+	+	-
41	+	+	-	-	+	+	-

Número de cepas de SE	Gene		pH				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
42	+	+	-	-	+	+	-
43	+	+	-	-	+	+	-
44	+	+	-	-	+	+	-
45	+	+	-	-	+	+	-
46	+	+	-	-	+	+	-
47	-	+	-	-	+	+	-
48	+	+	-	-	+	+	-
49	+	+	-	-	+	+	-
50	+	+	-	-	+	+	-
51	+	+	-	-	+	+	-
52	+	+	-	-	+	+	-
53	+	+	-	-	+	+	-
54	+	+	-	-	+	+	-
55	+	+	-	-	+	+	-
56	+	+	-	-	+	+	-
57	+	+	-	-	+	+	-
58	-	+	-	-	+	+	-
59	+	+	-	-	+	+	-
60	+	+	-	-	+	+	-
61	-	+	-	-	+	+	-
62	+	+	-	-	+	+	-
63	-	+	-	-	+	+	-
64	+	+	-	-	+	+	-
65	+	+	-	-	+	+	+
66	+	+	-	-	+	+	-
67	-	+	-	-	+	+	-
68	-	+	-	-	+	+	-
69	-	+	-	-	+	+	-
70	+	+	-	-	+	+	-
71	+	+	-	-	+	+	-
72	-	+	-	-	+	+	-
73	+	+	-	-	+	+	-
74	+	+	-	-	+	+	-
75	+	+	-	-	+	+	-
76	+	+	-	-	+	+	-
77	+	+	-	-	+	+	-
78	+	+	-	-	+	+	-
79	+	+	-	-	+	+	-
80	+	+	-	-	+	+	-
81	+	+	-	-	+	+	-
82	+	+	-	-	+	+	-
83	+	+	-	-	+	+	-
84	+	+	-	-	+	+	-
85	+	+	-	-	+	+	-
86	+	+	-	-	+	+	-
87	-	-	-	-	+	+	-
88	+	+	-	-	+	+	-

Número de cepas de SE	Gene		pH				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0
89	+	+	-	-	+	+	-
90	+	+	-	-	+	+	-
91	+	+	-	-	+	+	-
92	+	+	-	-	+	+	-
93	+	+	-	-	+	+	+
94	+	+	-	+	+	+	-
95	+	+	-	-	+	+	-
96	+	+	-	-	+	+	-
97	+	+	-	+	+	+	-
98	+	+	-	-	+	+	-
99	+	+	-	-	+	+	-
100	+	+	-	-	+	+	-

ANEXO III

TABELA 1. Presença dos genes de virulência *spvC* e *invA* em *Salmonella* Enteritidis (SE) e sua multiplicação em diferentes temperaturas de cultivo.

Número de cepa de SE	Gene		Temperatura (°C)				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	10	25	40	55	70
1	+	+	-	-	+	-	-
2	+	+	-	-	+	-	-
3	-	+	-	-	+	-	-
4	-	+	-	-	+	-	-
5	-	+	-	-	+	-	-
6	-	+	-	-	+	-	-
7	+	+	-	-	+	-	-
8	-	+	-	-	+	-	-
9	-	+	-	-	+	-	-
10	+	+	-	-	+	-	-
11	-	+	-	-	+	-	-
12	+	+	-	-	+	-	-
13	-	+	-	-	+	-	-
14	+	+	-	-	+	-	-
15	+	+	-	-	+	-	-
16	-	+	-	-	+	-	-
17	+	+	-	+	+	-	-
18	-	+	-	-	+	-	-
19	+	+	-	-	+	-	-
20	-	-	-	-	+	-	-
21	-	+	-	-	+	-	-
22	+	+	-	-	+	-	-
23	+	+	-	-	+	-	-
24	+	+	-	-	+	-	-
25	-	+	-	-	+	-	-
26	+	+	-	-	+	-	-
27	+	+	-	-	+	-	-
28	-	+	-	-	+	-	-
29	+	+	-	-	+	-	-
30	+	+	-	-	+	-	-
31	+	+	-	-	+	-	-
32	+	+	-	-	+	-	-
33	+	+	-	-	+	-	-
34	-	+	-	-	+	-	-
35	-	-	-	-	+	-	-
36	+	+	-	-	+	-	-
37	+	+	-	-	+	-	-
38	-	+	-	-	+	-	-
39	+	+	-	-	+	-	-
40	+	+	-	-	+	-	-

Número de cepa de SE	Gene		Temperatura (°C)				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	10	25	40	55	70
41	+	+	-	-	+	-	-
42	+	+	-	-	+	-	-
43	+	+	-	-	+	-	-
44	+	+	-	-	+	-	-
45	+	+	-	-	+	-	-
46	+	+	-	-	+	-	-
47	-	+	-	-	+	-	-
48	+	+	-	-	+	-	-
49	+	+	-	-	+	-	-
50	+	+	-	-	+	-	-
51	+	+	-	-	+	-	-
52	+	+	-	-	+	-	-
53	+	+	-	-	+	-	-
54	+	+	-	-	+	-	-
55	+	+	-	-	+	-	-
56	+	+	-	-	+	-	-
57	+	+	-	-	+	-	-
58	-	+	-	-	+	-	-
59	+	+	-	-	+	-	-
60	+	+	-	+	+	-	-
61	-	+	-	-	+	-	-
62	+	+	-	-	+	-	-
63	-	+	-	-	+	-	-
64	+	+	-	-	+	-	-
65	+	+	-	+	+	-	-
66	+	+	-	-	+	-	-
67	-	+	-	-	+	-	-
68	-	+	-	-	+	-	-
69	-	+	-	-	+	-	-
70	+	+	-	-	+	-	-
71	+	+	-	-	+	-	-
72	-	+	-	-	+	-	-
73	+	+	-	-	+	-	-
74	+	+	-	-	+	-	-
75	+	+	-	-	+	-	-
76	+	+	-	-	+	-	-
77	+	+	-	-	+	-	-
78	+	+	-	-	+	-	-
79	+	+	-	-	+	-	-
80	+	+	-	-	+	-	-
81	+	+	-	-	+	-	-
82	+	+	-	-	+	-	-
83	+	+	-	-	+	-	-
84	+	+	-	-	+	-	-
85	+	+	-	-	+	-	-
86	+	+	-	-	+	-	-
87	-	-	-	-	+	-	-

Número de cepa de SE	Gene		Temperatura (°C)				
	<i>spvC</i>	<i>invA</i>	10	25	40	55	70
88	+	+	-	-	+	-	-
89	+	+	-	-	+	-	-
90	+	+	-	-	+	-	-
91	+	+	-	-	+	-	-
92	+	+	-	-	+	-	-
93	+	+	-	+	+	-	-
94	+	+	-	-	+	-	-
95	+	+	-	-	+	-	-
96	+	+	-	-	+	-	-
97	+	+	-	-	+	-	-
98	+	+	-	-	+	-	-
99	+	+	-	-	+	-	-
100	+	+	-	-	+	-	-

TRABALHOS CIENTÍFICOS

TRABALHO PUBLICADO

**Revista Brasileira de Ciência Avícola
Brazilian Journal of Poultry Science
Suplemento 10, pág. 225, 2008**

CORRELAÇÃO ENTRE GENES DE VIRULÊNCIA E SOBREVIVÊNCIA EM CONDIÇÕES IMPRÓPRIAS DE CULTIVO DE *Salmonella* Enteritidis ISOLADA DE MATERIAL AVÍCOLA

AS Okamoto¹; RL Andreatti Filho¹; TS Rocha¹; REP Pereira¹; A Menconi¹; J Rodrigues².

1 Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Departamento de Clínica Veterinária Laboratório de Ornitopatologia Botucatu-SP Brasil;

2 Universidade Estadual Paulista Instituto de Biociências Departamento de Microbiologia Botucatu-SP Brasil.

TRABALHO ENVIADO PARA REVISTA

International Journal of Poultry Science

**RELATION BETWEEN THE *SpvC* AND *InvA* VIRULENCE GENES AND
RESISTANCE OF *Salmonella enterica* serotype Enteritidis ISOLATED
FROM AVIAN MATERIAL**

A. S Okamoto¹; RL Andreatti Filho¹; TS Rocha¹; A Menconi¹; G.A. Marietto-Gonçalves¹.

1 Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Departamento de Clínica Veterinária Laboratório de Ornitopatologia Botucatu-SP Brasil;

TRABALHO ENVIADO PARA REVISTA

Brazilian Journal of Poultry Science

**DETECÇÃO E TRANSFERÊNCIA DO GENE DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA *integron* em *Salmonella* Enteritidis PROVENIENTE DE
MATERIAL AVÍCOLA**

A. S Okamoto¹; RL Andreatti Filho¹; TS Rocha¹; A Menconi¹; G.A. Marietto-Gonçalves¹.

1 Universidade Estadual Paulista Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Departamento de Clínica Veterinária Laboratório de Ornitopatologia Botucatu-SP Brasil;