

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

***Salmonella* Enteritidis DE ORIGEM AVIÁRIA: DETERMINAÇÃO DE
PADRÕES DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, DETECÇÃO DE MUTAÇÃO
NO GENE *gyrA* DE CEPAS RESISTENTES AO ÁCIDO NALIDÍXICO,
FAGOTIPAGEM E RIBOTIPAGEM**

Autor: Aldemir Reginato Ribeiro

**Tese apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Veterinárias na
área de Sanidade Avícola**

**Orientador: Vladimir Pinheiro do
Nascimento**

PORTO ALEGRE

2007

R484s Ribeiro, Aldemir Reginato

Salmonella enteritidis de origem aviária: determinação de padrões de resistência antimicrobiana, detecção de mutação no gene *gyrA* de cepas resistentes ao ácido nelidíxico, fagotipagem e ribotipagem./ Aldemir Reginato Ribeiro - Porto Alegre: UFRGS, 2007.

100 f.; il. – Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2007. Vladimir Pinheiro do Nascimento, Orient.

1. Salmonella enteritidis: patogenicidade 2. Ribotipagem: veterinária 3. Salmonella enteritidis: proteína *gyrA*: mutação 4. Tipagem de fagos: veterinária I. Nascimento, Vladimir Pinheiro do, Orient. II. Título

CDD 619.602605

Catálogo na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

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

Aldemir Reginato Ribeiro

***Salmonella* Enteritidis DE ORIGEM AVIÁRIA: DETERMINAÇÃO DE PADRÕES
DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA, DETECÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE
gyrA DE CEPAS RESISTENTES AO ÁCIDO NALIDÍXICO, FAGOTIPAGEM E
RIBOTIPAGEM**

Aprovada em 27/04/2007

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Benito Guimarães de Brito
Membro da Comissão

Prof. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Membro da Comissão

Prof. Dra. Maristela Lovato Flôres
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos àqueles que de alguma forma contribuíram para realização e elaboração deste trabalho. Sou particularmente grato,

- aos meus pais, Antonio Carlos Ribeiro e Maria Helena Reginato Ribeiro.
- à minha irmã, Adriana Reginato Ribeiro.
- ao orientador Professor Dr. Vladimir Pinheiro do Nascimento.
- ao Professor Dr. Manoel Adrião Gomes Filho e a Madriano Christilis R. Santos, do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- aos professores, colegas e funcionários do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em especial a Aline Kellermman e Silvio Luís da Silveira Rocha.
- aos profissionais do Setor de Microbiologia do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) Recife – Pernambuco, Dalila Angélica Moliterno Duarte, Ana Mércia Mendes Vasconcelos, Juliana Vital Domingos Silva, Patrícia Lúcia Arruda de Andrade, Andressa Paiva Santana, Lúcia Sadae Pereira da Costa de Arruda Falcão.
- à coordenadora do LANAGRO / Recife – Pernambuco, Dra. Diana Sione Barbosa Pinheiro.
- a Dra. Dulce Maria Tochetto Schuch, LANAGRO / RS.
- a Dra. Josinete Barros de Freitas, Coordenadora da Microbiologia – CGAL/MAPA.
- ao Dr. Abrahão Buchastsky, coordenador do LANAGRO / Campinas - São Paulo.
- ao Dr. Amaury dos Santos, do LANAGRO / Campinas - São Paulo.
- aos professores e funcionários do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- a Dra. Eliane Moura Falavina dos Reis e a Dra. Christiane Soares Pereira, da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, pela identificação final dos sorovares de *Salmonella* e pela fagotipificação.
- ao CNPq, pelo financiamento do trabalho

SUMÁRIO

	p.
LISTA DE TABELAS.....	5
RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 <i>Salmonella</i>.....	12
2.2 Salmonelose Aviária.....	12
2.3 <i>Salmonella</i> em Carne de Frango.....	15
2.4 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	16
2.5 Métodos de Identificação das <i>Salmonellae</i>.....	18
2.5.1 Métodos Fenotípicos de Identificação de <i>Salmonella</i>.....	18
2.5.2 Métodos Genotípicos de Identificação de <i>Salmonella</i>.....	19
2.6 Resistência Antimicrobiana.....	20
2.7 Mutação na DNA gyrase de <i>Salmonella</i> Quinolona Resistente.....	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
CAPÍTULO I - <i>Salmonella</i> spp. IN RAW BROILER PARTS: OCCURRENCE, ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE AND PHAGE TYPING OF THE <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS ISOLATES.....	34
CAPÍTULO II - RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM <i>Salmonella</i> Enteritidis ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE AVES.....	47
CAPÍTULO III - RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGO.....	60
CAPÍTULO IV - DETECÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE <i>gyrA</i> DE <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS RESISTENTES AO ÁCIDO NALIDÍXICO.....	68
CAPÍTULO V - FAGOTIPOS DE <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS E DO AMBIENTE CRIATÓRIO DE AVES E DE CARCAÇAS DE FRANGO.....	80
CAPÍTULO VI - RIBOTIPAGEM DE <i>Salmonella</i> ENTERITIDIS ISOLADAS DE CARCAÇAS DE FRANGO.....	90
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	98

LISTA DE TABELAS

	p.
CAPÍTULO I	
Tabela 1. Antimicrobial resistance in <i>Salmonella</i> strains isolated from raw broiler parts.....	46
Tabela 2. Distribution of antimicrobial resistance patterns in <i>Salmonella</i> strains.....	46
CAPÍTULO II	
Tabela 1. Resistência antimicrobiana de 79 cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	59
Tabela 2. Distribuição dos padrões de resistência das cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	59
CAPÍTULO III	
Tabela 1. Distribuição dos padrões de resistência a antimicrobianos de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	67
Tabela 2. Resistência antimicrobiana das 17 cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	67
CAPÍTULO IV	
Tabela 1. Distribuição das mutações no gene <i>gyrA</i>	79
CAPÍTULO V	
Tabela 1. Distribuição dos fagotipos de <i>S. Enteritidis</i> de acordo com a origem e período de isolamento.....	89
CAPÍTULO VI	
Tabela 1. Distribuição dos ribotipos de cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	97

RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o objetivo de gerar dados de resistência a agentes antimicrobianos de *Salmonella* Enteritidis (SE) isoladas de amostras clínicas e do ambiente criatório de aves, nos anos de 1999, 2000 e 2001, de cortes de frango, no ano de 1996, ambos na região Sul, bem como de carcaças de frango, nos anos de 2004 e 2005, na região Nordeste, detectar mutação no gene *gyrA* da região determinante de resistência a quinolonas das cepas que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e fagotipá-las. Realizou-se também a ribotipagem de 28 cepas de SE isoladas de carcaças resfriadas de frango no ano de 2004, na região Sudeste.

Cento e dezesseis cepas de SE foram submetidas a testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos e os resultados indicaram que 84,6% (99/117) das cepas de *Salmonella* Enteritidis apresentaram resistência a um ou mais agentes antimicrobianos, sendo que o maior percentual está entre as cepas isoladas de carcaças resfriadas de frango, 100% (17/17), seguidas pelas isoladas de cortes de frango, 85,7% (18/21) e das de amostras clínicas e de ambiente criatório de aves, 81% (64/79).

Cepas com diferentes níveis de resistência foram encontradas para ampicilina (0,8%), canamicina (1,7%), ciprofloxacina (1,7%), enrofloxacina (10,2%), gentamicina (14,5%), estreptomicina (16,2%), ácido nalidíxico (35,9%), nitrofurantoína (47%) e tetraciclina (59%). Nenhuma das 117 cepas de *Salmonella* Enteritidis foi resistente ao cloranfenicol, norfloxacina e polimixina B.

Dentre as 99 amostras de SE que apresentaram resistência, 66,6% (66), foram resistentes a dois ou mais agentes antimicrobianos. Trinta e três cepas (33,3%), foram resistentes somente a um agente antimicrobiano, 16 a tetraciclina, 12 a nitrofurantoína, três ao ácido nalidíxico, uma a estreptomicina e uma a gentamicina.

Para detectar mutação no gene *gyrA* da região determinante de resistência a quinolonas, 42 cepas de SE que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico foram submetidas a reação em cadeia da polimerase e sequenciamento. Das 42 cepas, 30 (71,4%) apresentaram algum tipo de mutação no gene *gyrA* da região determinante de resistência a quinolonas. As alterações gênicas ocorreram nos aminoácidos dos codons Gly-81 (3,5%), Asp-82 (3,5%), Ser-83

(31%) ou Asp-87 (62%). As mutações continham alterações de Gly para Asp (n: 1) no codon 81, Asp para Asn (n: 1) no codon 82, Ser para Phe (n: 9) no codon 83 e Asp para Tyr (n: 9) ou Asn (n: 9) no codon 87. Uma amostra apresentou uma inclusão do aminoácido prolina entre os codons 56 e 57.

A fagotipificação de 116 cepas de SE apresentou que 68,9% (80/116) pertencem ao fagotipo (FT) 4, 15,5% (18/116) ao FT 4a, 12,2% (14/116) ao FT 1, 0,9% (1/116) ao FT6, 0,9% (1/116) ao FT 6a, 0,9% (1/116) ao FT 7 e 0,9% (1/116) ao FT 7a.

Quando leva-se em consideração a origem dos isolados, observamos que nas SE isoladas de amostras clínicas e ambientais criatório de aves, 56,4% pertencem ao FT 4, 21,8% ao FT 4a, 17,9% ao FT 1, 1,3% ao FT 6, 1,3% ao FT 6a e 1,3% ao FT 7a. Nas amostras isoladas de carne cortes de frango, o FT 4 predomina com 95,2% (20/21) e 4,8% (1/21), pertencem ao FT 7. Nos isolados de carcaças resfriadas de frango 94,1% são do FT 4 e 5,9% (1/17) do FT 4a.

A caracterização por ribotipagem foi realizada utilizando-se o RiboPrinter® system (DuPont), e apresentou quatro diferentes ribotipos, sendo que o mais comum foi o 25-S-1 (82,1%), seguido pelo 29-S-5 (10,7%) e 28-S-5 e 38-S-3 com 3,5% cada um.

Baseados nos dados do presente estudo, conclui-se que: houve uma elevada percentagem de cepas de *Salmonella Enteritidis* resistente a um ou mais agentes antimicrobianos, indicando que levantamentos contínuos são necessários na indústria avícola e que existe a necessidade de um uso responsável dos agentes antimicrobianos, baseado na compreensão da ecologia da resistência, da transmissão da bactéria resistente e de genes de resistência, da relação entre o uso do antibiótico e aumento da resistência e de um conhecimento de intervenções efetivas; Que assim como em outros trabalhos amostras de *S. Enteritidis* resistentes ao ácido nalidíxico, isoladas no Brasil, também apresentam mutação no gene *gyrA*, da região determinante de resistência a quinolonas; Que o FT 4 foi o predominante e que entre as cepas de *S. Enteritidis* isoladas de aves e de seu ambiente criatório existe uma maior diversidade de fagotipos quando comparada as isoladas de carcaças de frango; E que ao avaliarmos os dados gerados pela ribotipagem observamos um baixo grau de diversidade gênica entre as cepas de *Salmonella Enteritidis* utilizadas no presente estudo.

ABSTRACT

This work aimed to evaluate the antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis (SE) isolated from clinical and environmental poultry samples, during the years of 1999, 2000 and 2001, broiler chicken parts, in 1996, both in Southern Brazil, broiler chicken carcasses, during the years 2004 and 2005, in Northeastern Brazil, detect mutations in the *gyrA* gene from nalidixic acid resistant and identify their phage type. Also, 28 SE strains isolated during the year 2004 in Southeastern Brazil were characterized by ribotyping.

The antimicrobial resistance test was performed using the disk diffusion method on Mueller-Hinton Agar. The results indicated that 84.6% (99/117) of SE strains were resistant to at least one of the antimicrobial agents tested. Resistance at different levels was found to ampicillin (0.8%), kanamycin (1.7%), ciprofloxacin (1.7%), enrofloxacin (10.2%), gentamycin (14.5%), streptomycin (16.2%), nalidixic acid (35.9%), nitrofurantoin (47%), and tetracycline (59%). None of the SE strains were resistant to chloramphenicol, norfloxacin and polymyxin B.

Among the 99 SE strains showing resistance, 66.6% (66) presented multiple resistance, to two or more antimicrobial agents. Thirty-three strains (33.3%) were resistant to only one of the antimicrobial agents, 16 to tetracycline, 12 to nitrofurantoin, 3 to nalidixic acid, 1 to gentamycin, and 1 to streptomycin.

Forty-two nalidixic acid resistant strains were submitted to PCR and sequencing to detect *gyrA* mutation genes. Thirty SE strains (71.4%) showed at least one mutation in *gyrA* genes of quinolone resistance determining region (QRDR), in the codons corresponding to Gly-81 (3,5%), Asp-82 (3,5%), Ser-83 (31%) or Asp-87 (62%). These mutants contained a change from Gly to Asp (n: 1) at codon 81, Asp to Asn (n: 1) at codon 82, Ser to Phe (n: 9) at codon 83 and Asp to Tyr (n: 9) or Asn (n: 9) at codon 87. In one sample there was a Pro inclusion between the 56 and 57 codons.

The phage typing of 116 SE isolates showed that 68.9% (80/116) belonged to the phage type (PT) 4, 15.5% (18/116) to the PT 4a, 12.2% (14/116) to the PT 1, 0.9% (1/116) to the PT 6, 0.9% (1/116) to the PT 6a, 0.9% (1/116) to the PT 7, and 0.9% (1/116) to the PT 7a.

The ribotyping characterization was done using RiboPrinter® system (DuPont), and

showed four different ribotypes. The most common ribotype was 25-S-1 (82.1%). The other ribotypes were 29-S-5 (10.7%), 38-S-3 (3.6%) and 28-S-5 (3.6%).

In conclusion, the antimicrobial resistance levels presented here suggest a high occurrence of *Salmonella* Enteritidis strains resistant to at least one antimicrobial agent, indicating the need for continuous surveillance in the poultry industry, and the need for responsible use of antimicrobial agents in food animals, based on a understanding of the ecology of resistance, the transmission of both bacteria and resistance genes, the relationship between antimicrobial agents use and resistance amplification, and the knowledge of effective interventions. *S. Enteritidis* nalidixic acid resistant strains isolated in Southern and Northeastern Brazil showed mutation in the *gyrA* gene of QRDR. Phage type 4 was the most common isolated and among *S. Enteritidis* strains isolated from clinical and environmental poultry samples there were a higher phagetype diversity when compared with broiler chicken carcasses. The *S. Enteritidis* strains that were ribotyping showed a lower degree of genetic diversity.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella*, composto por 2.523 sorovares, baseados em reações bioquímicas e sorológicas (POPOFF *et al.*, 2003), tem sido um dos principais envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares, sendo que o aumento na incidência do mesmo está associado ao aumento no consumo de produtos avícolas (TODD, 1980).

Nas aves, as salmoneloses têm três formas de apresentação: pulorose, causada pela *Salmonella Pullorum*, tifo aviário, causado pela *Salmonella Gallinarum* (ambas sorovares adaptadas às aves e sem motilidade) e infecções paratíficas, causadas pelos demais sorovares de *Salmonella* (espécies não adaptadas às aves e que apresentam motilidade) (SNOEYENBOS & WILLIANS, 1991).

No início da avicultura comercial, criação intensiva, a *Salmonella Pullorum* e a *Salmonella Gallinarum* eram os principais problemas de salmonelose. A partir de um trabalho intensivo de diagnóstico e eliminação de aves portadoras, praticamente eliminou-se estes sorovares dos plantéis avícolas, porém este fato abriu espaço para outros sorovares.

Devido aos prejuízos causados pelas *Salmonella*, em todo o mundo, passou-se a implementar medidas de controle na avicultura, sendo que dentre estas medidas deve-se resaltar os seguintes pontos: aves de reposição livres de *Salmonella*, controle de vetores (insetos, pássaros, roedores), higiene e desinfecção adequada das instalações, utilização de rações sem contaminação com *Salmonella*, medidas de biossegurança nas propriedades e monitoramento microbiológico ambiental e das aves.

Agentes antimicrobianos, para medicar lotes de matrizes ou frangos de corte, também têm sido utilizados, tanto de forma curativa como da forma preventiva, bem como promotor de crescimento. Como exemplo de uso na forma preventiva temos a apreçoada por Goren (1994), que recomenda a combinação da aplicação de medicamentos e microflora intestinal, como ferramenta para controle de *Salmonella Enteritidis* em aves.

Segundo uma série de relatos, situações como esta tem provocado um aumento da resistência a agentes antimicrobianos por parte das *Salmonella*, fato este que tem conduzido a aplicação de princípios como o da precaução pela União Européia, a qual banuiu a utilização de promotores de crescimento com os princípios ativos: avoparcina,

virginamicina, espiramicina, tilosina e bacitracina de zinco, bem como do princípio da prova utilizado pelos Estados Unidos (TURNIDGE, 2004).

Porém, segundo Turnidge (2004), existe uma outra escolha, o princípio do uso prudente, o qual baseia-se em uma compreensão da ecologia da resistência, da transmissão da bactéria resistente e de genes de resistência, da relação entre o uso do agente antimicrobiano e aumento da resistência e de um conhecimento de intervenções efetivas.

Dentro do que foi exposto o presente trabalho visa realizar um estudo utilizando cepas de amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras de cortes de frango no ano de 1996, de amostras clínicas e do ambiente criatório (*swabs* de arrasto) de frango de corte e de matrizes isoladas nos anos de 1999, 2000 e 2001, ambos na Região Sul, e de carcaças resfriadas de frango isoladas nos anos de 2004 e 2005 na Região Nordeste, estudo este que será realizado com a utilização das seguintes ferramentas, determinação de padrões de resistência antimicrobiana, detecção de mutação no gene *gyrA* da região determinante de resistência a quinolonas de amostras resistentes ao ácido nalidíxico, fagotipificação e ribotipagem de amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frango na Região Sudeste no ano de 2004.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Salmonella*

O gênero *Salmonella*, nome este dado em homenagem a Daniel E. Salmon, médico veterinário do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA), pertence à família *Enterobacteriaceae* (SNOEYENBOS & WILLIAMS, 1991), sendo composto por 2.523 sorovares, baseados em reações bioquímicas e sorológicas (POPOFF *et al.*, 2003).

A classificação do gênero *Salmonella* obedece ao esquema de Kauffmann-White, que divide o mesmo em duas espécies, *S. enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica* apresenta seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, já a *Salmonella bongori*, apresenta uma única subespécie a *bongori* (POPOFF *et al.*, 2003).

A partir deste nível as salmonelas são classificadas em sorovares e agrupadas de acordo com seus antígenos somáticos. Segundo Doyle & Cliver (1990), o Manual Bergey classifica as salmonelas em 50 grupos, que recebem letras do alfabeto, A, B, C₁, C₂, D, etc., baseados na composição do antígeno somático, sendo que 98% das salmonelas isoladas pertencem aos 12 primeiros grupos.

O antígeno somático é parte da parede da célula, composto de lipopolissacarídeo, que contém endotoxinas que produzem febre no hospedeiro, quando a toxina atinge a corrente sanguínea (DOYLE & CLIVER, 1990).

Os flagelos, que são compostos por material protéico, prolongam-se além da parede da célula bacteriana, sendo responsáveis pela motilidade da mesma (DOYLE & CLIVER, 1990) e possuindo antígenos que são úteis na identificação final do agente.

Algumas cepas de *Salmonella*, tais como a *S. Typhi*, *S. Dublin* e *S. Hirschfeldii*, apresentam um antígeno capsular, Vi. Existe também o antígeno F ou pili tipo 1 (fímbrias), que emana da superfície da célula. Sugere-se que as fímbrias sejam fatores de adesão que permitem a *Salmonella* aderir-se às superfícies (DOYLE & CLIVER, 1990).

2.2 Salmonelose Aviária

O termo salmonelose aviária é usado para designar um grupo de doenças agudas ou crônicas, causadas por um ou mais membros do gênero *Salmonella* (SNOEYENBOS &

WILLIAMS, 1991).

De acordo com os mesmos autores, as aves domésticas constituem-se nos maiores reservatórios de *Salmonella* existentes na natureza. As salmonelas são mais freqüentemente relatadas em aves e produtos de origem aviária, particularmente por causa da grande população em risco e das atividades dos programas nacionais para isolamento e identificação.

No que diz respeito à sanidade aviária, a salmonelose tem três formas de apresentação: pulorose, causada pela *Salmonella Pullorum*, tifo aviário, causado pela *Salmonella Gallinarum* (ambas hospedeiras adaptadas às aves e sem motilidade), e paratifo aviário, causado pelos demais sorovares de *Salmonella* (espécies não-adaptadas às aves e que apresentam motilidade).

A pulorose pode acometer aves em todas as idades, sendo, porém mais comum nas aves jovens, nas quais a mortalidade pode ser mais elevada, uma vez que apresenta uma forma aguda septicêmica. Em aves adultas apresenta-se de forma crônica e localizada (SNOEYENBOS, 1991).

As aves que sobrevivem podem apresentar empenamento ruim e crescimento inadequado para a idade, porém nos casos de matrizes pesadas e poedeiras comerciais, cujo ciclo de vida é maior, as mesmas conseguem crescer dentro dos parâmetros zootécnicos esperados e produzir ovos, os quais podem estar contaminados, uma vez que uma das formas de transmissão é a transovariana (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

Os sinais clínicos que as aves apresentam são, sonolência, fraqueza, perda de apetite, retardo no crescimento, amontoamento, diarréia branca a branca amarelada e morte. Em algumas situações também se observa, cegueira e claudicação (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

O tifo aviário, por sua vez, é uma enfermidade de caráter septicêmico, cujo curso pode ser agudo ou crônico, aparecendo geralmente em plantéis de aves adultas (POMEROY & NAGARAJA, 1991).

Aves adultas infectadas pelo tifo aviário apresentam queda no consumo de ração, sonolência, apatia, penas arrepiadas, cabeça pálida, cristas encolhidas e diarréia amarelo-esverdeada a esverdeada. Pode também ocorrer queda de postura (BERCHIERI JÚNIOR,

2000).

A mortalidade causada pela *Salmonella Gallinarum* em um lote pode variar de 10 a 80% (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

A distribuição destas salmoneloses é mundial, porém, devido aos planos de controle, os quais se baseiam em provas sorológicas e eliminação de lotes contaminados, são consideradas erradicadas em alguns países como, por exemplo, Estados Unidos e Canadá (SNOEYENBOS, 1991; POMEROY & NAGARAJA, 1991).

No Brasil, embora a pulorose e o tifo aviário estejam sob controle, foram dignosticados casos nas décadas de 80 e 90 (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

O paratífo aviário é uma doença aguda ou crônica, causada por qualquer *Salmonella* que não a *S. Pullorum* e a *S. Gallinarum* (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

A distribuição é mundial, infectando principalmente aves jovens, com até duas semanas de idade (NAGARAJA *et al.*, 1991). As aves mais velhas normalmente tornam-se portadoras assintomáticas. Segundo Berchieri Júnior & Barrow (1995), as aves adultas parecem ser mais resistentes à doença.

A transmissão das salmonelas paratíficas pode ocorrer de forma vertical (via ovo) e/ou horizontal (via oral). A transmissão vertical pode ocorrer através da ingestão de água e/ou de ração contaminada, bem como pela ingestão de material fecal (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

Segundo Barrow & Lovell (1991), a transmissão vertical, via ovo, da *Salmonella* Enteritidis pode ocorrer devido à colonização nos folículos ováricos e oviduto ou por contaminação fecal seguida de penetração através da casca.

A sintomatologia apresentada por aves infectadas pelas salmonelas paratíficas vai depender da idade das mesmas. Segundo Nagaraja *et al.* (1991), aves adultas não apresentam sinais clínicos claros, sendo raro que ocorram surtos agudos em condições naturais. Na forma aguda, observa-se: inapetência, aumento no consumo de água, diarreia e desidratação.

Nas aves jovens, fatores ambientais, grau de exposição e a presença de infecções intercorrentes têm uma participação importante na severidade de um surto. Os sinais clínicos que se observam são: sonolência, cabeça baixa, olhos fechados, asas caídas, penas

arrepiadas, anorexia, aumento no consumo de água, diarreia aquosa profusa com emplastamento de cloaca e tendência das aves a se aglomerarem junto à fonte de calor. Sintomatologia respiratória é incomum. Em surtos superagudos com mortes ocorrendo no incubatório ou nos primeiros dias de idade, as aves podem não apresentar sintomatologia (NAGARAJA *et al.*, 1991).

A mortalidade nas aves jovens depende da intensidade da infecção e do sorovar da *Salmonella* envolvido, já nas aves adultas a mortalidade não é comum (BERCHIERI JÚNIOR, 2000).

2.3 *Salmonella* em Carne de Frango

O consumo de carne de aves tem aumentado a nível mundial nos últimos anos, trazendo paralelamente uma preocupação, o aumento das toxinfecções alimentares causadas por *Salmonella* (TODD, 1980).

A presença de *Salmonella* no intestino, na pele e entre as penas das aves pode causar contaminação das carcaças durante o abate e o processamento (HUMPHREY *et al.*, 1988). A bactéria, que foi introduzida pelas aves no frigorífico é espalhada para todas as dependências e equipamentos, comprometendo a qualidade do produto final para o consumo humano (OLSEN *et al.*, 2003).

Segundo Green (1987) *apud* Lillard (1989), o “Food Safety and Inspection Service” realizou um levantamento nos Estados Unidos e concluiu que somente 3 a 4% dos frangos de corte que chegam aos frigoríficos avícolas são positivos para *Salmonella*, enquanto que cerca de 35% das aves processadas que saem para o consumo são positivas para esta bactéria.

Os números da incidência de *Salmonella* nos produtos avícolas, especialmente em carne de aves, variam muito: nos Estados Unidos, estudo realizado por Green *et al.* (1982), comparando a incidência de *Salmonella* em carcaças de frango nos anos de 1967 e 1979, demonstrou um aumento da ordem de 8,3%, já que em 1967, 28,6% das 597 carcaças de aves analisadas eram positivas, enquanto que em 1979, o mesmo estudo revelou que este percentual havia subido para 36,9%.

Também nos Estados Unidos, Bokany Jr *et al.* (1990) afirmaram que 43% das 142

amostras (carcaças e partes de frango), pesquisadas entre julho de 1987 e janeiro de 1988 apresentavam-se contaminadas por *Salmonella*.

Na Tailândia, Jerngklinchan *et al.* (1994) isolaram *Salmonella* em 66% (467/705) das amostras de carne de frango analisadas, já no Senegal, Bada-Alambedji *et al.* (2006) encontraram que 62,5% das carcaças de frango coletadas em pontos de venda de Dakar estavam contaminadas com *Salmonella*.

Em Portugal, a contaminação encontrada por Machado & Bernardo (1990) foi da ordem de 57%, por sua vez Antunes *et al.* (2003) obtiveram uma incidência de 60%, em amostras de carne de aves coletadas na cidade do Porto.

Seguindo na península Ibérica, porém na Espanha, Domínguez *et al.* (2002), encontraram que 35,8% das amostras de carne de frango analisadas continham algum nível de contaminação por *Salmonella*.

No Reino Unido, Plummer *et al.* (1995), encontraram contaminação por *Salmonella* em 22,8% (77/325) dos produtos avícolas analisados vendidos no varejo (carcaças, peitos, asas e coxas).

Estudos em diferentes estados brasileiros tem apresentado diferentes níveis de isolamento de *Salmonella* em carcaças de frango, 15,1% no Rio Grande do Sul (NASCIMENTO *et al.*, 2003), 13% em Santa Catarina (MACHADO *et al.*, 1994), 5,9%, 10,4%, 32% e 42% em São Paulo (MATHEUS *et al.*, 2003; COSTA *et al.*, 1996; SANTOS *et al.*, 2000; FUZIHARA *et al.*, 2000), 16,9% em Goiás (MESQUITA *et al.*, 2005) e 9,5% em Pernambuco (VASCONCELLOS *et al.*, 2005).

2.4 *Salmonella* Enteritidis

Historicamente o primeiro relato de toxinfecção alimentar produzido pela *Salmonella* Enteritidis foi descrito por A. Gärtner, em 1888, na Alemanha, quando o mesmo isolou o agente causal, *Bacillus enteritidis*, a partir da carne de um bovino e do baço de um homem que havia falecido após ter consumido carne bovina crua (POPPE, 1999).

Na segunda metade da década de 80, infecções em humanos causada pela *Salmonella* Enteritidis tiveram um aumento a nível mundial, passando a ser considerada uma pandemia (RODRIGUE *et al.*, 1990).

As infecções, causadas pela *Salmonella* Enteritidis, em humanos, normalmente são associadas a ovos ou produtos contendo ovos e ao consumo de carne de aves (BRYAN & DOYLE, 1995).

Nas aves, inicialmente, os principais causadores de problemas eram a *Salmonella* Pullorum e a *Salmonella* Gallinarum, as quais foram praticamente erradicadas devido aos programas de monitoramento e erradicação (SNOEYNBOS, 19991; POMEROY e NAGARAJA, 1991).

Baumler *et al.* (2000), postulam que devido à erradicação das mesmas abriu-se um nicho que foi ocupado pela *Salmonella* Enteritidis, uma vez que tanto a *Salmonella* Enteritidis como a *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum pertencem ao sorogrupo D1, indicando uma similaridade de cadeia lipopolissacarídica e que possuem fimbria SEF14, que pode estar envolvida na colonização do tecido reprodutivo, e é encontrada somente em poucos agentes do grupo D (TURCOTTE & WOODWARD, 1993).

Vários relatos têm confirmado infecções em aves por *Salmonella* Enteritidis, sendo que esta ampla difusão sugere a transmissão vertical como principal responsável, uma vez que lotes infectados podem passar despercebidos quando não apresentarem sintomatologia e nem efeito na produção de ovos (O'BRIEN, 1990).

No Brasil, mais precisamente no Estado de São Paulo, em isolados de fontes humanas, a *Salmonella* Enteritidis saltou de 1,2% em 1991 para 64,9% em 1995 (TAVECHIO *et al.*, 1996).

A *Salmonella* Enteritidis também tem sido o sorovar predominante em isolados cuja fonte não tenha sido humanos, mas sim, gêneros alimentícios, animais, meio ambiente, água, água de esgotos, ração animal, vísceras, fezes, fontes não conhecidas (TAVECHIO *et al.*, 2002) e carcaças de frango (SANTOS *et al.*, 2000; NASCIMENTO *et al.*, 2003).

Em isolados de aves portadoras e doentes provenientes de diversas regiões do país durante o período de 1961 a 1991, os isolados predominantes foram *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Infantis (HOFER *et al.*, 1997), porém em isolados no quinquênio 1992 - 1996, a *Salmonella* Enteritidis passou a ser o sorovar predominante, representando 61,7% (SOLARI *et al.*, 1997), fato que tem se mantido conforme estudo

realizado por Kanashiro et al. (2005), no período compreendido entre julho de 1997 a dezembro de 2004.

2.5 Métodos de Identificação de *Salmonella*

Estudos epidemiológicos, bem como o comércio entre países que mantem diferentes níveis de biosegurança na produção animal e diferentes níveis de higiene nas unidades de abate e produção de alimentos de origem animal, exigem cada vez mais ferramentas nas investigações que caracterizam os microrganismos.

Para a caracterização dos microrganismos podemos utilizar tanto ferramentas fenotípicas, como genotípicas ou a combinação de ambas.

2.5.1 Métodos Fenotípicos de Identificação das *Salmonella*

Nas investigações das *Salmonella*, que se utiliza características fenotípicas, através de esquemas, tem-se uma classificação do sorovar e do fagotipo.

A identificação dos sorovares da *Salmonella* é determinada principalmente pela caracterização sorológica das amostras, com soros anti-*Salmonella* somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (K ou Vi). Este esquema permite o reconhecimento dos sorovares com base nas propriedades antigênicas das fases um e dois das proteínas flagelares (antígenos H1 e H2), e pelos antígenos de superfície (parede celular lipopolissacarídica, antígeno O) (LI *et al.*, 1994).

Já a fagotipificação baseia-se no emprego de bacteriófagos ou fagos, que podem infectar determinadas bactérias, gerando um padrão de lise que divide uma espécie bacteriana em fago-resistentes ou fago-sensíveis (ANDERSON & WILLIAMS, 1956). Esta habilidade dos fagos para distinguir variedades entre salmonelas de um mesmo sorovar fez com que houvesse uma aceitação e desenvolvimento da fagotipificação como uma ferramenta nos procedimentos epidemiológicos (GERSHMAN, 1976).

Após tentativas realizadas por Gershman (1976) e Alonso *et al.* (1987), para estabelecer um esquema de fagotipificação para *Salmonella Enteritidis*, Ward *et al.* (1987), estabeleceram um esquema que demonstrou um alto grau de discriminação entre as cepas testadas e contendo 10 tipos de fagos, definindo 27 padrões distintos.

Fagotipificação de cepas de *Salmonella* Enteritidis em diferentes países tem apresentado diferentes fagotipos (FT) predominantes. Na Holanda (VAN DUIJKEREN *et al.*, 2002), Alemanha (SCHOETER *et al.*, 1994) e Inglaterra (LIEBANA *et al.*, 2001), o fagotipo predominante foi o FT 4, na Espanha (ECHEITA *et al.*, 2005) e na região Sul do Chile (PRAT *et al.*, 2001) o FT 1 e no Canadá (KHAKHRIA *et al.*, 1991) e Estados Unidos (HICKMAN-BRENNER *et al.*, 1991) o FT 8.

No Brasil, Fernandes *et al.* (2003), utilizando 105 amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas no estado de São Paulo, no período entre 1975-95, identificaram sete fagotipos, sendo o FT 8 o predominante no período 1975-92, 64% dos isolados. Após este período, o FT 4 passou a ser o predominante com 40% dos isolados, fato este corroborado por estudos posteriores, como o de Santos *et al.* (2003), que em 83 amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas no Rio Grande do Sul no período entre 1995-97 identificaram o FT 4 como predominante, com 71,1% dos isolados e o de Nunes *et al.* (2003), que em amostras isoladas de aves, carne de aves, alimentos, humanos, *pipped embryos*, ração animal e amostras ambientais do ambiente de aves, também identificaram o FT 4 (79,1%) como o mais comum entre os fagotipos.

Outra técnica fenotípica utilizada na discriminação de linhagens é o perfil de resistência a agentes antimicrobianos, porém a mesma tem valor limitado, uma vez que é uma característica codificada por plasmídeos ou que resulta de mutações genéticas espontâneas como resposta a uma pressão seletiva. Além disso, a resistência a determinados antimicrobianos pode ser conferida por plasmídeos totalmente diferentes, mas capazes de produzir o mesmo padrão de resistência em amostras não relacionadas (TACKET, 1989).

2.5.2 Métodos Genotípicos de Identificação das *Salmonella*

Para que uma técnica genotípica obtenha sucesso na caracterização de um microrganismo é importante que em uma população haja um certo grau de polimorfismo genômico. No caso das *Salmonella* Enteritidis que apresentam elevada estrutura clonal em sua população, técnicas poderosas são necessárias para detectar diferenças entre os isolados (LIEBANA, 2002).

Para detectar diferenças nas *Salmonella* várias técnicas têm sido aplicadas. Técnicas

estas que podem ser baseadas em enzimas de restrição, como eletroforese de campo pulsante (PFGE), análise do polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP) e ribotipagem, na amplificação, polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) e amplificação por reação em cadeia da polimerase de elementos palindrômicos extragênicos repetitivos (Rep-PCR), e nas seqüências nucleotídicas, técnica para tipificação de múltiplos loci (MLSP) (YAN *et al.*, 2004).

Dentre as técnicas citadas a ribotipagem é uma técnica que apresenta um elevado grau de tipificação, estabilidade, boa sensibilidade, fácil interpretação dos ribotipos e a possibilidade de normalização de dados (LIEBANA, 2002).

Esta técnica permite a determinação de diferentes clones nos sorovares de *Salmonella* (LIEBANA, 2002).

A habilidade da ribotipagem em discriminar isolados de *Salmonella* é dependente da enzima de restrição utilizada (OSCAR, 1998), sendo que estudos já têm sido desenvolvidos para demonstrar diferenças entre as enzimas de restrição utilizadas.

Uma outra habilidade que a ribotipagem possui é o potencial para automação da técnica, como demonstrado por Oscar (1998).

2.6 Resistência Antimicrobiana

A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos é um sério problema a nível mundial (NASTASI *et al.*, 2000), sendo que este problema tem aumentado devido ao mau uso ou uso exagerado de agentes antimicrobianos não somente em medicina humana, mas também em medicina veterinária e agricultura (WHO, 2000).

Em medicina veterinária os agentes antimicrobianos são usados de forma terapêutica, metafílica, profilática e como promotores de crescimento (SCHARWZ *et al.*, 2001). Muitas vezes estes procedimentos levam ao uso indiscriminado, o que favorece a geração de cepas resistentes (BERCHIERI JÚNIOR, *et al.*, 1989).

A resistência pode ser causada por alguns mecanismos que envolvem diminuição no acúmulo do agente antimicrobiano, modificação física ou destruição do agente antimicrobiano e alteração do sítio alvo da droga (VELGE *et al.*, 2005).

Embora o uso de agentes antimicrobianos esteja sob controle de prescrição veterinária, na Espanha, os proprietários tendem a usá-los como profiláticos nas criações intensivas, principalmente de bovinos, suínos e aves (USERA *et al.*, 2002).

Segundo Mandall (1995) *apud* Arvanitidou *et al.*, (1998), a utilização de agentes antimicrobianos na alimentação dos frangos faz com que eles possam excretar cepas de *Salmonella* resistentes, ocorrendo contaminação cruzada durante o abate e a preparação de carcaças, podendo, estes patógenos, passar para a cadeia alimentar.

Dentro da questão cepas de *Salmonella* resistentes na cadeia alimentar, um dos principais problemas, é o aumento na frequência de cepas de *Salmonella* que apresentam multi resistência a drogas isoladas de infecções causadas por toxinfecções alimentares (TASSIOS *et al.*, 2000).

A multi resistência a drogas, no gênero *Salmonella*, tem sido muito investigada na *Salmonella* Typhimurium, fagotipo DT 104, sendo que a resistência padrão neste caso é expressa para a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina (RIBOT *et al.*, 2002).

Com relação a *Salmonella* Enteritidis a questão resistência antimicrobiana tem-se apresentado de forma ambígua, pois em estudos como o realizados por Nastasi *et al.* (2000), com amostras isoladas de humanos e animais na Itália, apresentaram uma pequena percentagem de amostras resistentes, fato este que também foi observado por Ling *et al.* (1998), com amostras isoladas de humanos em Hong Kong, já Tassios *et al.* (1997), na Grécia encontraram uma percentagem elevada, 67,4% das *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, animais e alimentos, apresentaram resistência a agentes antimicrobianos.

Boonmar *et al.* (1998), encontraram uma elevação de 2,8% de cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frango congeladas resistentes a antibióticos no ano de 1993, para 21,2% em 1994, na Tailândia.

2.7 Mutações na DNA *gyrase* de *Salmonella* quinolona resistente

As quinolonas são um grupo de agentes antimicrobianos sintéticos que surgiram no início da década de 60, quando durante o processo de síntese da cloroquina, agente para tratamento da malária, chegou-se ao ácido nalidíxico. Na década de 80, a partir da adição de

um átomo de flúor na posição seis da molécula da quinolona, surgiram as fluoroquinolonas (TORTORA *et al.*, 2000; RUIZ, 2003).

Este grupo de agentes antimicrobianos atua na topoisomerase II, DNA gyrase e topoisomerase IV (RUIZ, 2003).

A DNA gyrase, é composta por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e tem como função catalizar o super enrolamento negativo do DNA, ou seja, são essenciais para a manutenção da topologia do DNA (HOROWITZ & WANG, 1987).

A topoisomerase IV, também é um tetrâmero composto por duas subunidades C e duas subunidades E, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, cuja principal função é a separação dos cromossomos das células filhas no processo de replicação (PENG & MARIANS, 1993).

O local de atuação das quinolonas difere nos microrganismos Gram negativos e nos Gram positivos. Nas bactérias gram negativas, o alvo é a DNA gyrase, enquanto nas gram positivas é a topoisomerase IV (RUIZ, 2003).

Estudos recentes tem apresentado um aumento na resistência a quinolonas por parte das *Salmonella* na Alemanha (MALORNY, *et al.*, 1999), Finlândia (HAKENEN, *et al.*, 1999), Inglaterra e País de Gales (THRELFALL, *et al.*, 2000), Dinamarca (MØLBAK, *et al.*, 2002), Espanha (MARIMÓN, *et al.*, 2004) e Coréia (CHOI *et al.*, 2005), sendo que em alguns casos os autores relacionam tal fato a liberação, por parte dos órgãos competentes pela área de medicamentos dos seus respectivos países, das quinolonas para uso na produção animal.

A resistência as quinolonas é determinada fundamentalmente por mecanismos mediados por alterações no cromossomo, alteração nos sítios de ligação da DNA gyrase e diminuição no acúmulo do agente no interior da bactéria, devido à impermeabilidade da membrana e ou da expressão acima do normal do sistema de bombas (PIDDOCK, 2002; RUIZ, 2003).

A presença de uma mutação simples em uma das posições da região determinante de resistência a quinolonas, localizada entre os aminoácidos Ala-67 – Gln-106 da *gyrA*, normalmente resulta em um nível elevado de resistência ao ácido nalidíxico, sendo que nas

Salmonella as mutações mais comuns ocorrem na Ser-83 ou no Asp-87, a qual pode ser simples ou dupla (PIDDOCK, 2002; RUIZ, 2003), porém alterações a nível da Gly-81 e Asp-82 também já foram relatadas (REYNA *et al.*, 1995; LEVY *et al.*, 2004).

Estudo realizado por Giraud *et al.* (1999), sugere que as mutações nos codons Ser-83 e Asp-87 da *gyrA* não são igualmente distribuídas entre os diferentes sorovares. Os sorovares Newport, Virchow e Typhimurium apresentaram mutação prevalente no codon 83, já nos sorovares Hadar e Kottbus a mutação que prevaleceu foi no codon 87.

Salmonella Enteritidis resistentes ao ácido nalidíxico, isoladas na Espanha, apresentaram uma frequência maior de mutação no codon Asp-87 (86,6%), enquanto somente 13,4% das cepas apresentaram mutação no Codon Ser-83 (SOTO *et al.*, 2003).

Piddock *et al* (1998), utilizando *Salmonellae* isoladas de animais no Reino Unido, observaram que 80,6% das cepas apresentaram mutação no codon Asp-87, 16,8% no codon Ser-83 e 2,6% uma mutação chamada pelos mesmos de *wild-type*. Neste estudo, porém, muitas *S. Enteritidis* isoladas de um lote de aves em uma propriedade que estava utilizando enrofloxacina apresentaram mutação no codon Ser-83, Ser para Phe.

Por sua vez Liebana *et al.* (2002), obtiveram uma distribuição de mutação no gene *gyrA* mais equilibrada nos codons Ser-83 (50,5%) e Asp-87 (49,5%), utilizando-se de um painel de *Salmonella enterica* resistentes ao ácido nalidíxico isoladas de animais na Inglaterra e País de Gales.

Elementos móveis que carregam o gene *qnr*, também tem sido descritos como responsáveis por conferir resistênica a quinolonas, sendo que estes apresentam um agravante, o fato de terem o potencial de transferir de forma horizontal os genes de resistênica (RUIZ, 2003).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALONSO, R., ECHEITA, P., ESPINOSA, P., USERA. Attempts to establish phage typing as an epidemiological marker for *Salmonella* Enteritidis. **Annales De L' Institut Pasteur/Microbiologie**, Paris, v. 138, p. 579-585, 1987.
- ANDERSON, E.S., WILLIAMS, R.E.O. Bacterophage typing of enteric pathogens and Staphilococci and its use in epidemiology. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 9, p. 94-115, 1956.
- ANTUNES, P., RÉU, C., SOUZA, J.C., PEIXE, L., PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.82, p.97-103, 2003.
- ARVANITIDOU, M., TSAKRIS, A., SOFIANOU, D., KATSOUYANNOPOULOS, V. Antimicrobial resistance and R-factor transfer of *Salmonellae* isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 197-201, 1998.
- BADA-ALAMBEDJI, R., FOFANA, A., SEYDI, M., AKAKPO, A.J. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 510-515, 2006.
- BARROW, P.A., LOVELL, M.A., Experimental infection of egg-laying hens with *Salmonella enteritidis* phage 4. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 20, p. 335-348, 1991.
- BAÜMLER, A.J., HARGIS, B.M., TSOLIS, R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, St. Joseph, v. 287, p. 50-52. 2000.
- BERCHIERI JÚNIOR, A., PAULILO, A.C., FERNANDES, S.A., PESSÔA, G.V.A., ROSSI JUNIOR, O.D., IRINO, K., ÁVILA, F.A., CALZADA, C.T. *Salmonella* em um abatedouro avícola. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v. 3, n. 1, p. 81-87, 1987.
- BERCHIERI JÚNIOR, A., ADACHI, S.Y., CALZADA, C.T., PAULILLO, A.C., SCHOKEN-ITURRINO, R.P., TAVECHIO, A.T. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 9, p. 9-12, 1989.
- BERCHIERI JUNIOR, A., BARROW, P.A. Patologia e métodos de diagnósticos de SE em aves. In: CONFERÊNCIA APINCO 1995 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 1995, Curitiba. **Anais**. Curitiba, Brasil: Fundação APINCO de Ciência. 1995. p. 1-5.
- BERCHIERI JÚNIOR, A. Salmoneloses Aviárias. In: A. BERCHIERI JÚNIOR & M.

- MACARI, ed., **Doença das Aves**. 1^a. ed. Campinas: FACTA, 2000. p. 185-194.
- BOKANYI JR, R.P., STEPHENS, J.F., FOSTER, D.N. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. **Poultry Science**, Savoy, v. 69, p. 592-598, 1990.
- BOONMAR, S., BANGTRAKULNONT, A., PORNRUANGWONG, S., SAMOSORNSUK, S., KANEKO, K., OGAWA, M. Significant increase in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from human beings and chicken meat in Thailand. **Veterinary Microbiology**, Amstedam, v. 62, p. 73-80. 1998.
- BRYAN, F.L., DOYLE, M.P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **Jornal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 3, p. 326-344. 1995.
- CEBRIAN, L., SIRVENT, E., DÍAZ, J.C.R., ROYO, R.G. Characterisation of *Salmonella* spp. mutants produced by exposure to various fluoroquinolones. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 22, p. 134-139, 2003.
- COSTA, F.M., ROSSI JÚNIOR, O.D., NADER FILHO, A., TAVECHIRO, A.T. Sorovares de *Salmonella* isoladas de carcaças e cortes de frango obtidos na indústria e no comércio em Jaboticabal, Estado de São Paulo, em 1996. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, Niterói, v. 4, n. 3, p. 97-100. 1997.
- CHOI, S.H., WOOD, J.H., LEE, J.E., PARK, S.J., CHOO, E.J., KWARK, Y.G., KIM, M.N., CHOI, M.S., LEE, N.Y., LEE, B.K., KIM, N.J., JEONG, J.Y., RYU, J., KIM, Y.S. Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.56, p. 1111-1114. 2005
- DOMINGUEZ, C., GÓMEZ, I., ZUMALACÁRREGUI, J. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 72, p.165-168, 2002.
- DOYLE, M.P., CLIVER, D.O. *Salmonella*. In: D.O. CLIVER, ed., **Foodborne Diseases**. London: Academic Press, 1990, p. 185-204.
- ECHEITA, M.A., ALDUEÑA, A.M., DÍEZ, R., ARROYO, M. CÉRDAN, F., GUTIÉRREZ, R., DE FUENTE, M., GONZÁLEZ-SANZ, R., HERRERA-LÉON, S., USERA, M.A. Distribución de los fagotipos de *Salmonella* de origen humano aislados en España en 1997-2001. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínicas**, Barcelona, v.23, p.127-134, 2005.
- FUZHARA, T.O., FERNANDES, S.A., FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small

poultry Slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.63, n.12, p.1749-1753, 2000.

FERNANDES, S.A., GHILARDI, A.C.R., TAVECHIO, A.T., MACHADO, A.M.O., PIGNATARI, A.C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.

GERSHMAN, M. Phage Typing System for *Salmonella* enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 32, p. 190-191, 1976.

GIRAUD, E., BRISABOIS, A., MARTEL, J.L., CHASLUS-DANCLA, E. Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- an in vivo- selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 43, n. 9, p. 2131-2137, 1999.

GOREN, E. Combinación de la aplicación de medicamentos y microflora intestinal como una herramienta em el tratamiento de las infecciones por *Salmonella enteritidis* em aves. In: CURSO DE ACTUALIZACION SOBRE EL CONTROL Y PREVENCION DE LA INFECCION POR *Salmonella Enteritidis*, 1., 1994, México, D.F. **Anais**. México:ANECA. 1994. p. 13-26.

GREEN, S.S., MORAN, A.B., JOHNSTON, R.W., UHLER, P., CHIU, J. The incidence of *Salmonella* species and serotypes in young whole chicken carcasses in 1979 as compared with 1967. **Poultry Science**, Savoy, v. 61, p. 288-293, 1982.

GUTIÉRREZ-COGCO, L., GONZÁLEZ-BONILLA, C., GIONO-CERZO, S., BELTRÁN, L.G., Principales sorotipos de *Salmonella* identificados em 10703 cepas em México entre 1982 y 1993. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, México, D.F., v. 36, p. 221-226, 1994.

HAKANEN, A., SITONEN, A., KOTILAINEN, P., HUOVINEN, P. Increasing fluoroquinolone resistance in *salmonella* seerotyping in Finland during 1995-1997. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 43, p. 145-148, 1999.

HICKMAN-BRENNER, F.W., STUBBS, A.D., FARMER III, J.J. Phage typing of *Salmonella enteritidis* in the United States. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 29, p. 2817-1823, 1991.

HOFER, E., SILVA FILHO, S.J., REIS, E.M.F.R. Prevalência de serovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, p.55-62. 1997.

HOROWITZ, D.S., WANG, J.C. Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. **Journal of Biological Chemistry**, Oxford, v. 262, p. 5339-5244. 1987.

- HUMPHREY, T.J., MEAD, G.C., ROWE, B. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 100, p. 175-184, 1988.
- JERNGKLINCHAN J., KOOWATANANUKUL, C., DAENGPROM, K., SAITANU, K. Occurrence of *Salmonellae* in raw broiler and their products in Thailand. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.57, p.808-810, 1994.
- KANASHIRO, A.M.I., STOPPA, G.F.Z., CARDOSO, A.L.S.P., TESSARI, E.N.C., CASTRO, A.G.M. Serovars of *Salmonella* spp. isolated from broiler chickens and commercail breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Brazilian Journal of Poultry Science**, São Paulo, v. 7, p.195-198, 2005.
- KHAKHRIA, D., DUCK, D., LIOR, H. Distribution of *Salmonella enteritidis* phage types in Canada. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 106, p. 25-32, 1991
- LI, J., NELSON, K., McWHORTER, A.C., WHITTAM, T.S. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, Washington, v.91, p. 2552-2556, 1994.
- LEVY, D.A., SHARMA, B., CEBULA, T.A. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolone in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 48, p. 2355-2363, 2004.
- LIEBANA, E., MIGURA, L.G., BRESLIN, M.F., DAVIES, R.H., WOODWARD, M.J. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from english poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 39, p. 154-161, 2001.
- LIEBANA, E. Molecular tools for epidemiological investigations of *S. enterica* subspecies *enterica* infections. **Research in Veterinary Science**, Amsterdam, n. 72, p. 169-175, 2002.
- LIEBANA, E., CLOUTING, C., CASSAR, C.A., RANDALL, L.P., WALKER, R.A., THREFFALL, E.J., CLIFTON-HADLEY, F.A., RIDLEY, A.M., DAVIES, R.H. Comparison of *gyrA* mutation, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.40, p. 1481-1486. 2002.
- LILLARD, H.S. Factors affecting the persistence of *Salmonella* during the processing of poultry. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 52, n. 11, p. 829-832, 1989.
- LING, J.M., KOO, I.C., KAM, K.M., CHENG, A.F. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains isolated in Hong

Konf from 1986 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1693-1699, 1998.

MACHADO, J., BERNARDO, F. Prevalence of *Salmonella* in chickens carcasses in Portugal. **Journal of Applied Bacteriology**, New Jersey, v. 69, p. 477-480, 1990.

MACHADO, R.A., TOSIN, I., LEITÃO, M.F.F. Occurrence of *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. in chickens during industrial processing. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.25, n.4, p.239-244, 1994.

MALORNY B., SCHROETER, A., HELMUTH, R. Incidence of quinolones resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Cambridge, v. 43, n. 9, p. 2278-2282. 1999.

MARIMÓN, J.M., GOMAÁRIZ, M., ZIGORRAGA, C., CILLA, G., PÉREZ-TRALLERO, E. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Cambridge, v. 48, p. 3789-3793. 2004.

MATHEUS, D.P., RUDGE, A.C., GOMES, S.M.M. Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.62, n.2, p.111-115, 2003.

MESQUITA, A.J., CARVALHO, R.N., REZENDE, C.S.M., COUTO, M.V., MESQUITA, A.Q., BUENO, V.F.F. Isolamento de *Salmonella* spp em carcaças de frango resfriadas de abatedouros de aves do Estado de Goiás, Brasil. XIV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. **Anais**. Goiânia. 2005. P.251.

MØLBAK, K., GERNER-SMIDT, P., WEGENERT, H.C. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, New Rochelle, v. 8, n. 5, p. 514-515, 2002.

NAGARAJA, K.V., POMERY, B.S., WILLIAMS, J.E. Paratyphoid Infections. In: B.W. CALNEK, ed., **Disease of Poultry**. 9 ed. Iowa: Iowa State University Press, Ames, 1991, p. 99-130.

NASCIMENTO, V.P., RIBEIRO, A.R., SANTOS, L.R., ROCHA, A.C.G.P., SCHUCH, D.M.T., SILVA, A.B., SALLE, C.T.P., CARDOSO, M.O., ROCHA, S., VIEIRA, J.S., PONTES, A.P., OLIVEIRA, S.D., GUAHYBA, A.S. Salmoneloses paratíficas em avicultura: uma revisão e situação atual. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais**. Campo Grande, Brasil: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias. 1996. p.S 15.1.

NASCIMENTO, V.P., SALLE, C.T.P., MORAES, H.L.S., FITTÉL, A.P., KELLERMANN, A., STRECK, A.F., RIBEIRO, A.R., SANTOS, L.R. Prevalência de *Salmonella* sp. em

produtos de origem avícola no período de Maio de 1995 a Abril de 1996. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis, Brasil: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 2003.

NASTASI, A., MAMMINA, C., CANNOVA, L. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis, Southern Italy, 1990-1998. **Emerging Infectious Diseases**, New Rochelle, v. 6, n. 4, p. 401-403, 2000.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Test; Approved Standard-Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road , Suíte 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003).

NUNES, I.A., HELMUTH, R., SCHROETER, A., MEAD, G.C., SANTOS, M.A.A., SOLARI, C.A., SILVA, O.R., FERREIRA, A.J.P. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 66, p. 324-327, 2003.

O'BRIEN, J.D.P. Aspects of *Salmonella* enteritidis control in poultry. **World's Poultry Science Journal**, Cambridge, v. 46, n. 46, p. 119-124, 1990.

OSCAR, T.P. Identification and characterization of *Salmonella* isolates by automated ribotyping. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 61, p. 519-524, 1998.

OLSEN J.E., BROWN, D.J., MADSEN, M., BISGAARD, M. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, Bedford, v. 94, p. 826-835, 2003.

PENG, H., MARIANS, K.J. *Escherichia coli* topoisomerase IV, purification, characterization, subunits structure, and subunits interactions. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 268, p. 24481-24490, 1993.

PIDDOCK, L.J.V., RICCI, V., MCLAREN, I., GRIGGS, D.J. Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.41, p.635-641, 1998.

PIDDOCK, L.J.V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from human and food animals. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, 26, 3-16, 2002.

PLUMMER, R.A.S., BLISSET, S.J., DODD, C.E.R. *Salmonella* contamination of retail chicken products sold in the UK. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 58, n. 8, p. 843-846, 1995.

POMEROY, B.S., NAGARAJA, K.V. Fowl Typhoid. In: B.W. CALNEK, ed., **Disease of**

Poultry. 9 ed. Iowa: Iowa State University Press, Ames. 1991. p.87-99.

POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J., GHEESLING, L.L., Supplement 2001 (n° 45) to the Kauffmann – White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 154, p. 173-174. 2003.

POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control**. 1 ed. Ames: Iowa State University Press, 1999, p. 33-41.

PRAT, S., FERNÁNDEZ, A., FICA, A., FERNÁNDEZ, M.A., HEITMANN, I. Tipificación fágica de aislados de *Salmonella enteritidis* de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. **Revista Panamericana de Salud Pública**, Washington, v.9, p.7-12. 2001

REYNA, F., HUESCA, M., GONZÁLEZ, V., FUCHS, Y. *Salmonella typhimurium gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Cambridge, v. 39, p. 1621-1623, 1995.

RIBEIRO, A.R., NASCIMENTO, V.P., CARDOSO, M.O., SANTOS, L.R., ROCHA, S.L.S. Utilization of immunomagnetic separation for detection of *Salmonella* in raw broiler parts. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 339-341, 2002.

RIBOT, E.M., WIERZBA, R.K., ANGULO, F.J., BARRETT, T.J. *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Dt 104 isolates from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. **Emerging Infectious Diseases**, New Rochelle, v. 8, n. 4, p. 387-391, 2002.

RODRIGUE, D.C., TAUXE, R.V., ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? **Epidemiology and Infection**, London, n. 105, p. 21-27, 1990.

RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolone: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v. 51, p. 1109-1117. 2003.

SANTOS S.M.S., BERCHIERI JR., A., FERNANDES, S.A., TAVECHIO, A.T., AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 20, p. 39-42, 2000.

SANTOS, L.R., NASCIMENTO, V.P., OLIVEIRA, S.D., RODRIGUES, D.P., REIS, E.M.F., SEKI, L.M., RIBEIRO, A.R., FERNANDES, S.A. Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, v. 45, n. 1, p. 1-4, 2003.

SCHOETER, A., WARD, L.R., ROWE, B., PROTZ, D., HARTUNG, M., HELMUTH, R. *Salmonella enteritidis* phage types in Germany. **European Journal of Epidemiology**,

Springer v. 10, p. 645-648, 1994.

SCHWARZ, A., KEHRENBORG, C., WASH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.17, p.431-437, 2001.

SNOEYENBOS, G.H., WILLIAMS, J.E. Salmonellosis. In: B.W. CALNEK, ed., **Diseases of Poultry**. 9 ed. Iowa: Iowa State University Press, Ames. 1991, p. 72-73.

SNOEYENBOS, G.H. Pullorum Disease. In: B.W. CALNEK, ed., **Disease of Poultry**. 9 ed. Iowa: Iowa State University Press, Ames. 1991, p.73-86.

SOLARI, C.A., REIS, E.M.F., COSTA, R.G., FEITOSA, D.P., RODRIGUES, D.P., HOFER, E. Caracterização dos sorovares de *Salmonella* isolados de aves de diferentes Estados no quinquênio 1992-96. Congresso Brasileiro de Microbiologia. 19, p. 126. 1997. Rio de Janeiro. **Anais**. Rio de Janeiro, Brasil: Sociedade Brasileira de Microbiologia 1997.

SOTO, S.M., GONZÁLEZ-HEVIA, A., MENDOZA, M.C. Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutation conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Oxford, v.51, p.1287-1291. 2003.

TACKET, C.O. Molecular epidemiology of *Salmonella*. **Epidemiologic Reviews**, Cary, v. 11, p. 99-108. 1989.

TASSIOS, P.T., MARKOGIANNAKIS, A., VATAPOULOS, A.C., KATSANIKOU, E., VELONAKIS, E.N., KOREA-KREMASTINO, J., LEGARKIS, N.J. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* during a 7-year period in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 6, p. 1316-1321, 1997.

TASSIOS, P.T., CHAADJICHRISTODOULOU, C., LAMBIRI, M., KANSOUZIDOU-KANAKOUDII, A., SARANDOPOULOU, Z., KOUREA-KREMASTINO, J. Molecular typing of multidrug-resistant *Salmonella* Blockley outbreak isolates from Greece. **Emerging Infectious Diseases**, New Rochelle, n.6, p.60-64, 2000.

TAVECHIO, A.T., FERNANDES, S.A., NEVES, B.C., DIAS, A.M.G., IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.38, p.315-322, 1996.

TAVECHIO, A.T., GHILARDI, A.C.R., PERESI, J.T.M., FUZIHARA, T.O., YONAMINE, E.K., JAKABI, M., FERNANDEZ, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 65, p. 1041-1044. 2002.

- THRELFALL, E.J., WARD, L.R., SKINNER, J.A., GRAHAM, A. Antimicrobial drug resistance in non-typhoidal *Salmonellas* from humans in England and Wales in 1999: decrease in multiple resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Virchow, and Hadar. **Microbiology Drug Resistance**, New Rochelle, v. 6, p.319-325, 2000.
- TODD, E.C.D. Poultry-associated foodborne disease - its occurrence, cost, sources and prevention. **Journal Food Protection**, Des Moines, v. 43, n. 2, p. 129-139, 1980.
- TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. Drogas Antimicrobianas. In: TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L. ed., **Microbiologia**. 6 ed. Rio Grande do Sul: Artmed Editora S.A. 20000, p.531-556.
- TURCOTTE, C., WOODWARD, M.J. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of gene encoding the SEF 14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. **Journal of General Microbiology**, Edinburgh, v. 139, p. 1477-1485, 1993.
- TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals – prejudices, perceptions and realities. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Washington, v. 53, p. 26-27, 2004
- USERA, M. A., ALADUENA, A., GONZÁLEZ, R., DE LA FUENTE, M., GARCÍA-PEÑA, J., FRÍAS, N., ECHEITA, M.A. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. **Journal of Food Proteccion**, Des Moines, v. 65, n. 5, p. 768-773, 2002.
- YAN, S.S., PENDRAK, M.L., ABELA-RIDDER, B., PUNDERSON, J.W., FEDORKO, D.P., FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, New York, v. 4, p. 189-204, 2004.
- VAN DUIJKEREN, E., WANNET, W.J.B., HOUWERS, D.J., VAN PELT, W. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, p. 3980-1985, 2002.
- VASCONCELOS, A.M.M., NASCIMENTO, K.F., DUARTE, D.A.M., SANTOS, S.B., RIBEIRO, A.R. Incidência de *Salmonella* sp. em carcaças resfriadas de frango produzidas no Estado de Pernambuco. XIV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. **Anais**. Goiânia. 2005. P.270
- VELGE, P., CLOECKAERT, A., BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, Les Ulis, v., 36, p. 267-288. 2005.
- WARD, L.R., DE SA, J.D.H., ROWE, B. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 99, p. 291-294, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 5-9 June 2000, "WHO global principles for containment of antimicrobial resistance in animals intended for food."WHO Department of Communicable Disease Surveillance and Response, (Internet, WWW), Address: http://www.who.int/emc/disease/zoo_global_principles/index.htm.

CAPÍTULO I

Salmonella spp. **IN RAW BROILER PARTS: OCCURRENCE, ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE AND PHAGE TYPING OF THE *Salmonella* ENTERITIDIS ISOLATES**

Salmonella spp. **EM CORTES DE FRANGO: OCORRÊNCIA, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E FAGOTIPIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Salmonella* Enteritidis**

Aldemir Reginato Ribeiro^{1*}, Aline Kellermann¹, Luciana Ruschel dos Santos², Marjo Cadó Bessa³, Vladimir Pinheiro dos Nascimento¹

¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

²Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil

³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

Corresponding author: mailing address: e-mail: aldemir_r@yahoo.com

Publicado: Brazilian Journal of Microbiology (2007) 38: 296-299

ABSTRACT

The present study was carried out to evaluate the occurrence of *Salmonellae* in raw broiler parts and to determine the antimicrobial resistance profile of the isolated strains. Twenty-four (39.3%) broiler parts samples were positive for *Salmonella* and twenty-five *Salmonella* strains were isolated, since two different serovars were detected in one single positive sample. *Salmonella* Enteritidis was the most prevalent serovar. Among *Salmonella* Enteritidis isolates, 95.2% belonged to Phage type 4 (PT4) (20/21) and 4.8% to PT7 (1/21). Twenty-two (88%) strains of *Salmonella* were resistant to at least one antimicrobial agent, generating eight different resistance patterns. The *S. Typhimurium* (n:1) and *S. Hadar* (n: 3) isolates presented multiple resistance. Three *S. Enteritidis* isolates were susceptible to all antimicrobial tested, two were resistant only to tetracycline. The high prevalence of *Salmonella* in the broiler parts strengthens the importance of the use of good manufacturing practises (GMP), and HACCP. The results also emphasize the need for the responsible use of antimicrobials in animal production.

Key Words: *Salmonella*, broiler parts, antimicrobial resistance, phage typing

Salmonella spp. **EM CORTES DE FRANGO: OCORRÊNCIA, RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA E FAGOTIPIFICAÇÃO DOS ISOLADOS DE *Salmonella*
Enteritidis**

RESUMO

Este trabalho foi conduzido para avaliar a ocorrência de *Salmonella* em cortes de frango e para determinar o perfil de resistência antimicrobiana das cepas isoladas. Vinte e quatro (39,3%) cortes de frango foram positivas para *Salmonella*, tendo sido isoladas vinte e cinco cepas de *Salmonella*, uma vez que em uma amostra isolaram-se dois sorovares. *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar prevalente. Entre as *Salmonella* Enteritidis isoladas, 95,2% pertencem ao Fagotipo 4 (FT4) (20/21) e 4,8% ao FT7 (1/21). Vinte e duas (88%) cepas de *Salmonella* foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano e oito diferentes padrões de resistência foram observados. *S. Typhimurium* (n: 1) e *S. Hadar* (n: 3), apresentaram múltipla resistência. Três cepas de *S. Enteritidis* foram sensíveis a todos os antimicrobianos e duas resistentes somente a tetraciclina. A elevada ocorrência de *Salmonella* nos cortes de frango utilizados no presente estudo reforça a importância das normas de boas práticas de fabricação, bem como dos controles de perigos e pontos críticos de controle. No tocante aos níveis de resistência a antimicrobianos, os resultados enfatizam a necessidade do uso responsável dos mesmos na produção animal.

Palavras chaves: *Salmonella*, partes de frango, resistência antimicrobiana, fagotipagem.

INTRODUCTION

Food from animal origin are important elements within the human food supply chain, but sometimes they can be a source of food-borne pathogens, such as *Salmonella*, especially in the case of poultry products, which are recognized as frequent vehicles for the transmission of that microorganism (29).

Salmonella, once introduced by live chickens or the others means into the processing plant, will progress along the processing line (19), jeopardizing the product's final microbiological quality for human consumption. The occurrence of *Salmonella* in broiler chicken cuts, in studies undertaken in different countries, can vary for instance from 1.5% in Northern Ireland (26) to 51.1% in Belgium(31).

Antimicrobials have been used in poultry as growth promoter, prophylactic, and for prophylactic or therapeutic purpose. However, their indiscriminate use is causing increasing resistance amongst *Salmonella* strains and other bacteria (4) which may be present in foods, and thus transmitted to humans through the food chain (1).

The present study was carried out to evaluate the occurrence of *Salmonella* in broiler chicken parts, to estimate the resistance profiles of the isolates and to phage type the *Salmonella* Enteritidis isolates.

MATERIAL AND METHODS

Collection of Samples

The study was carried out using 61 broiler chickens parts (wings, whole legs, boneless breasts and backs) collected in the period from September, 30 to December, 20, 1996, in a processing plant located in Southern Brazil.

Isolation and Identification Procedure

Salmonellae were isolated using the microbiological method, recommended by the Brazilian Agriculture Ministry (5). Briefly, 25g of skin and muscle, collected from each broiler chicken part under aseptic conditions, were homogenized in 225mL of 1% Buffered Peptone Water (BPW) (Merck AG, Darmstadt, Germany), and incubated $36\pm 1.0^{\circ}\text{C}$ for 16-20h (pre-enrichment step). One mL of the pre-enrichment broth was transferred into

9mL of Tetrathionate broth (Merck), and 0.1mL into 9.9mL of Rappaport-Vassiliadis broth (Merck), and incubated at $36\pm 1.0^{\circ}\text{C}$, and $41\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ respectively (selective enrichment step). After 24h, the selective enrichment cultures were streaked onto XLT4 (Difco, Detroit, MI, USA) and Rambach® (Merck) agar plates and incubated for 18-24h at $36\pm 1.0^{\circ}\text{C}$. Typical colonies were identified by biochemical and serological tests.

Complete antigenic characterization and serovar identification was performed by the Enteric Pathogens Laboratory from the Oswaldo Cruz Institute Foundation, Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ).

Antimicrobial Resistance Test

The antimicrobial resistance teste was performed using the disk diffusion method on Mueller-Hinton Agar, according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS) (18). The antimicrobials were ampicillin 10 μg , ciprofloxacin 5 μg , chloramphenicol 30 μg , enrofloxacin 5 μg , gentamicin 10 μg , kanamycin 30 μg , nalidixic acid 30 μg , nitrofurantoin 300 μg , norfloxacin 10 μg , polymixin B 300 I.U., streptomycin 10 μg , and tetracycline 30 μg . *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a reference strain. An isolated was classified as multiple resistant when demonstrated resistance to two or more agents (10).

Phage Typing

Twenty-one *Salmonella* Enteritidis isolates were phage typed at the FIOCRUZ-RJ. The phage types were determined according to Ward *et al.* (29). Samples were inoculated in tubes with 1.5mL of phage broth and incubeted, with agitation at 37°C for an average of two hours. Samples showing turbidity equivalent to the 0.5 level of the MacFarland scale were checked in a photocolorimeter. The selected phage broths were poured on phage agar plates, homogenized, and the excess of fluid was removed with a sterile pipette. The plates were left drying up for 20 minutes. Finally 10 μL from each one of the 10 selected phage solutions were poured into plates previously divided in ten quadrants, and incubated at 37°C for 24 hours.

RESULTS AND DISCUSSION

Twenty-four out of the 61 raw broiler parts samples (39.3%) were positive for *Salmonella*, which is in line with others papers investigating the incidence of *Salmonella* in frozen and refrigerated poultry cuts that reported 41.8% (30) and 51.1% (31) in Belgium, 42.4% in the United States (7), but differ from the 1.5% found in Northern Ireland (26). Surveys performed in Brazil, using broiler chicken cuts, indicated presence of *Salmonella* in 22.8% (11) and 35% of the samples (12) in São Paulo and 14.2% in Rio de Janeiro (23).

Factors such as the samples origin, the year in which the studies were undertaken, the number of samples and their condition (frozen or refrigerated), the sampling procedure, the flock level of contamination, the quality of sanitation applied in the processing plants, possible cross contamination between the products, and the testing methodology (6, 31), must be taken into consideration when comparing the results obtained in the present study.

Salmonella Enteritidis was the most frequent serovar, representing 21 (84%) of the 25 *Salmonellae* identified from the 24 positive samples. The other isolates were three *Salmonella* Hadar (12%) and one *Salmonella* Typhimurim (4%). In one sample, two serovars were detected, *S. Enteritidis* and *S. Hadar*.

The number of *S. Enteritidis* isolated in this work confirms the existing preoccupation regarding this serovar being frequently involved in food poisoning outbreaks in humans. This was true in Italy, where evidence of *S. Enteritidis* infection in humans increased from 2.4% to 57.1% between 1982 and 1992, and from 0.5% to 22.8% in foodstuffs (14). Similarly, 150 outbreaks of food poisoning caused by *S. Enteritidis* were recorded in Argentina between 1986 and 1993 (8).

In Brazil, *S. Enteritidis* has been the most prevalent serovar detected in human infections (27), in chicken carcasses (24), foodstuffs, the environment, water, sewage, chiller water, animal feed, animal viscera, faeces (28), and also in poultry flocks (15).

The phage typing of *S. Enteritidis* isolates showed that 95.2% (20/21) belonged to phage type 4 (PT 4) and 4.8% (1/21) to the PT 7. Phage type 4 had been shown to be the most common phage type in several countries.

Santos *et al.* (25), showed that 93.3% of *S. Enteritidis* isolated from broiler carcasses in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, belonged to PT4. In Spain, Domínguez *et al.* (13)

found PT4 isolates in 58.8% of retail chicken meat samples analysed, while Liebana *et al.*, (16) showed that PT4 was the most commonly phage type in English poultry farms.

Regarding the antimicrobial resistance, the present results (Table 1) indicated that 88% of *Salmonella* isolates (22/25) were resistance to one or more of the antimicrobial agents tested, presenting eight different patterns of resistance (Table 2). Multiple resistance was not observed in five of the 21 *S. Enteritidis* isolates, while three were susceptible to all antimicrobials tested and two were resistant only to tetracycline. Multiple resistance was also found in the *S. Typhimurium*, and in all three *S. Hadar* isolates.

Resistance to tetracycline was observed in 84% of the isolates, which higher than that the 46.6% found in Dakar, Senegal (3), the 36% in Porto, Portugal. (2), and also the 6.2% in Brazil (24). This elevated resistance may be explained by the possible diffusion of the *tet(A)* resistance gene, which was observed in Italy by Pezzella *et al.* (20) in an epidemiological study with *Salmonella* strains isolated from animals.

Resistance to nitrofurantoin (32%), and streptomycin (16%) was low when compared to respectively the 95% found by Cardoso *et al.* (9) in *S. Enteritidis*, and the 100% found by Ribeiro *et al.* (22) in *S. Hadar*.

The *Salmonellae* tested presented resistance to nalidixic acid (60%), and enrofloxacin (8%). Other authors like Molbak *et al.* (17) have also observed an increase in quinolone resistance to *Salmonella*, which is a cause for concern, since this resistance to *Salmonella* is mediated by chromosomes (21). On the other hand, we have not found resistance to norfloxacin and ciprofloxacin, which is in accordance to Cardoso *et al.* (9).

The high frequency of *Salmonella* (39.3%) in broiler parts detected in the present study can be explained by the more extensive handling of the birds during the processing, fact that reinforces the paramount importance of implementing good manufacturing practices (GMP), and Hazard Analysis of Critical Control Points (HACCP) systems. The level of antimicrobial resistance presented here highlights the need for responsible use of antimicrobial agents in food animals, and indicates the need for continuous surveillance.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to acknowledge CDPA-UFRGS' staff for their technical assistance, and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for the financial support.

REFERENCES

1. Aarestrup, F.M.(1999). Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 12, 279-285.
2. Antunes, P., Reu, C., Souza, J.C., Peixe, L., Pestana, N. (2003). Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.*, 82, 97-103.
3. Bada-Alamedji, R., Fofana,A., Sedi, M., Akakpo, A.J. (2006). Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Poultry Carcasses in Dakar (Senegal). *Braz. J. Microbiol.*, 37, 510-515.
4. Berchieri Jr., A., Adachi, S.Y., Calzada, C.T., Paulillo, A.C., Schoken-Iturrino, R.P., Tavechio, A.T. (1989). Farinha de Carne como Fonte de *Salmonella* em Granja Avícola. *Pesq. Vet. Bras.*, 9, 9-12.
5. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento / Secretaria de Defesa Agropecuária. Método Analítico de Carcaças de Aves e Pesquisa de *Salmonella*. Diário Oficial da União. Brasília, Portaria no 8, de 23 de janeiro de 1995. p. 1182-1184. 27 de janeiro de 1995. Seção I.
6. Bryan, F.L., Doyle, M.P. (1995). Health risk and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. *J. Food Prot.*, 58, 326-344.
7. Bokanyi Jr., R.P., Stephens, J.F., Foster, D.N. (1990). Isolation and Characterization of *Salmonella* from Broiler Carcasses or Past. *Poult. Sci.*, 69: 592-598.
8. Caffer, M.I., Eigner, T. (1994). *Salmonella enteritidis* in Argentina. *Int. J. Food Microbiol.*, 21, 15-19.
9. Cardoso, M.O., Ribeiro, A.R., Santos, L.R., Pilotto, F., Moraes, H.L.S., Salle, C.T.P., Rocha, S.L.S., Nascimento, V.P. (2006). Antibiotic Resistance in *Salmonella* Enteritidis Isolated from Broiler Carcasses. *Braz. J. Microbiol.*, 37, 368-371.
10. Carramiñana, J.J., Rota, C., Agústin, I., Herrera, A. (2004). High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet. Microbiol.*, 1004, 133-139.
11. Carvalho, A.C.F.B., Corte, A.L.L. (2005). *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes de frango. *Ciênc. Rural*, 35, 1465-1468.
12. Costa, F.N., Rossi Júnior., O.D., Nader Filho, A., Tavechio, A.T. (1997) Sorovares de *Salmonella* Isoladas de Carcaças e Cortes de Frango Obtidos na indústria e no comércio em Jaboticabal, Estado de São Paulo, em 1996. *Rev. Ciênc. Vet.*, 4, 97-100.
13. Domínguez, C., Gómez, I., Zumalacárregui, J. (2002). Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in retail chicken meat in Spain. *Int. J. Food Microb.*, 72, 165-168.
14. Fantasia, M., Filetici, E. (1994). *Salmonella enteritidis* in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, 21, 7-13.
15. Kanashiro, A.M., Stoppa, G.F.Z., Cardoso, A.L.S.P., Tessari, E.N.C., Castro, A.G.M. (2005). Serovars of *Salmonella* spp. Isolated from Broiler Chickens and Commercial Breeders in Diverse Regions in Brazil July 1997 to December 2004. *Braz. J. Polt. Sci.*, 7, 195-198.
16. Liebana, E., Garcia-Migura, L., Breslin, M.F., Davies, R.H., Woodward, M.J. (2001). Diversity os Strains of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis from English

- Poultry Farms Assessed by Multiple Genetic Fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, 39, 154-161.
17. Molbak, K., Gerner-Smidt, P., Wegerner, H.C. (2002). Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. *Emerging Infect. Dis.*, 8, 514-515.
 18. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2003) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS Document M2-A8. Wayne, Pennsylvania, USA.
 19. Olsen, J.E., Brown, D.J., Madsen, M., Bisgaard, M. (2003). Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 826-835.
 20. Pezzela, C., Ricci, A., DiGiannatale, E., Luzzi, I., Carattoli, A. (2004). Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolated from Animals in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 903-908
 21. Piddock, L.J.V. (2002). Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from human and food animals. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26, 3-16.
 22. Ribeiro, A.R., Kellermann, A., Santos, L.R., Fittél, A.P., Nascimento, V.P. (2006). Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Sorovar Hadar Isoladas de Carcaças de Frango. *Arq. Inst. Biol.*, 73, 357-360.
 23. Sá Barreto, E.S., Ramos, S.M. (1999). Pesquisa de *Salmonella* em cortes congelados de frango comercializados no Município do Rio de Janeiro. *Hig. Aliment.*, 13, 53-54.
 24. Santos, S.M.S., Berchieri Jr., A., Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., Amaral, L.A. (2000). *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pes. Vet. Bras.*, 20, 39-42.
 25. Santos, L.R., Nascimento, V.P., Oliveira, S.D., Rodrigues, D.P., Reis, E.M.F., Seki, L.M., Ribeiro, A.R., Fernandes, S. (2003). Phage Types of *Salmonella* Enteritidis Isolated from Clinical and Food Samples, and from Broiler Carcasses in Southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 45, 1-4.
 26. Soutos, N., Koidis, P., Madden, R.H. (2003). Presence of *Listeria* and *Salmonella* spp. In retail chicken in Northern Ireland. *Letters Appl. Microbiol.*, 37, 421-423.
 27. Tavechio, A.T., Fernandes, S.A., Neves, B.C., Dias, A.M.G., Irino, K. (1996). Changing Patterns of *Salmonella* Serovars: Increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, 38, 315-322.
 28. Tavechio, A.T., Ghilardi, A.C.R., Peresi, J.T.M., Fuzihara, T.O., Yonamine, E.K., Jakabi, M., Fernandez, S.A. (2002). *Salmonella* Serotypes Isolated from Nonhuman Sources in São Paulo Brazil, from 1996 through 2000. *J. Food Prot.*, 65, 1041-1044.
 29. Todd, E.C.D. (1980). Poultry-associated Foodborne Disease – Its Occurrence, Cost, Sources and Prevention. *J. Food Prot.*, 43, 129-139.
 30. Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., Neyts, K.D. (1998). Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. *Int. J. Food Microbiol.*, 40, 1-8.
 31. Uyttendaele, M., De Troy, P., Debevere, J. (1999). Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in Poultry Carcasses and Different Types of Poultry Products for Sale on the Belgian Retail Market. *J. Food Prot.*, 62, 735-740.

32. Ward, L.R., de Sa, J.D.H., Rowe, B. (1987). A phage typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidem. Infect.*, 99, 291-294.

Table 1. Antimicrobial resistance in *Salmonella* strains isolated from raw broiler parts

Serovars	Number of strains tested	Number of resistant strains (%)											
		AMP	CIP	CHL	ENR	GEN	KAN	NAL	NIT	NOR	PB	STR	TET
S. Enteritidis	21	0	0	0	2(9,5)	0	0	14(66.6)	8(38.1)	0	0	0	17(80.9)
S. Hadar	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3(100)	3(100)
S. Typhimurium	1	0	0	0	0	0	0	1(100)	0	0	0	0	1(100)
Total	25	0	0	0	2(8.0)	0	0	15(60.0)	8(32.0)	0	0	3(12.0)	21(84.0)

AMP: ampicillin; CIP: ciprofloxacin; CHL: chloramphenicol; ENR: enrofloxacin; GEN: gentamicin; KAN: kanamycin; NAL: nalidixic acid; NIT: nitrofurantoin; NOR: norfloxacin; PB: polymyxin B; STR: streptomycin; TET: tetracycline

Table 2. Distribution of antimicrobial resistance patterns in *Salmonella* strains

Patterns	S. Enteritidis	S. Hadar	S. Typhimurium	Total
Susceptible	3	-	-	3
TET	2	-	-	2
NAL, TET	6	-	1	7
STR, TET	-	3	-	3
NIT, TET	2	-	-	2
NAL, NIT	1	-	-	1
ENR, NAL, TET	2	-	-	2
NAL, NIT, TET	5	-	-	5

AMP: ampicillin; CIP: ciprofloxacin; CHL: chloramphenicol; ENR: enrofloxacin; GEN: gentamicin; KAN: kanamycin; NAL: nalidixic acid; NIT: nitrofurantoin; NOR: norfloxacin; PB: polymyxin B; STR: streptomycin; TET: tetracycline

CAPÍTULO II

**RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Salmonella* Enteritidis ISOLADAS DE
AMOSTRAS CLÍNICAS E AMBIENTAIS DE AVES**

**ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *Salmonella* Enteritidis ISOLATED FROM
CLINICAL AND ENVIRONMENTAL POULTRY SAMPLES**

Aldemir Reginato Ribeiro^{1*}, Aline Kellermann¹, Luciana Ruschel dos Santos² e
Vladimir Pinheiro do Nascimento¹

¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA – UFRGS), Rua Bento Gonçalves,
8824, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: aldemir_r@yahoo.com

² Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Curso de Medicina Veterinária,
Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil

RESUMO

Avaliou-se a resistência a agentes antimicrobianos de 79 cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE) isoladas de amostras clínicas e ambientais (*swabs* de arrasto) de frangos de corte e matrizes pesadas na região Sul do Brasil, nos anos de 1999, 2000 e 2001. Entre as 79 SE, 64 (81%), apresentaram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados, apresentando 22 diferentes perfis de resistência. Diferentes níveis de resistência foram encontradas para ampicilina (1,2%), canamicina (1,2%), ciprofloxacina (2,5%), enrofloxacina (8,8%), gentamicina (21,5%), estreptomicina (20,2%), nitrofurantoína (26,6%), ácido nalidíxico (30,4%) e tetraciclina (64,5%). Nenhuma SE foi resistente ao cloranfenicol, norfloxacina e polimixina B. Dentre as 64 SE que apresentaram resistência, 67,2% (43) apresentaram resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos. Vinte e uma SE (32,8%), foram resistentes a somente um agente antimicrobiano, 14 à tetraciclina, 3 ao ácido nalidíxico, 3 à nitrofurantoína e uma à gentamicina. Pode-se concluir que há um elevado número de cepas de SE resistentes à tetraciclina e a dois ou mais agentes antimicrobianos.

Palavras Chave: *Salmonella* Enteritidis, Resistência Antimicrobiana, Aves

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *Salmonella* Enteritidis ISOLATED FROM CLINICAL AND ENVIRONMENTAL POULTRY SAMPLES

Evaluated the antimicrobial resistance of 79 of *Salmonella* Enteritidis (SE) strains isolated from clinical and environmental poultry samples in the Southern Brazil during the years 1999, 2000 and 2001. Among the 79 samples, 64(81%) were resistant to at least one of the antimicrobial agents tested, showing 22 different resistance patterns. Tetracycline showed the highest percentage of the resistance among the antimicrobial agents used, 64.5%. Resistance at different level was found to ampicillin (1.2%), kanamycin (1.2%), ciprofloxacin (2.5%), enrofloxacin (8.8%), gentamicin (21.5%), streptomycin (20.2%), nitrofurantoin (26.6%), nalidixic acid (30.4%). None of the SE strains were resistant to chloramphenicol, norfloxacin and polymyxin B. Among the 64 SE strains that showed resistance, 67.2% (43) showed resistance to two or more antimicrobial agents. Twenty one (32.8%) strains was resistant to only one of the antimicrobial agents, fourteen to tetracycline, three to nalidixic acid, three to nitrofurantoin, and one to gentamycin. The antimicrobial resistance levels presented here, suggests a high occurrence of SE strains tetracycline resistant and resistance to two or more antimicrobial agents.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, antimicrobial resistance, poultry

INTRODUÇÃO

Nos últimos vinte anos têm sido observado um aumento no número de infecções causadas por *Salmonella* a nível mundial, particularmente pela *Salmonella* Enteritidis, passando a mesma ser considerada uma pandemia (Rodrigue et al., 1990).

Historicamente o primeiro relato de toxinfecção alimentar produzido pela *Salmonella* Enteritidis foi descrito por A. Gärtner, em 1888, na Alemanha, quando o mesmo isolou o agente causal, *Bacillus enteritidis*, a partir da carne de um bovino e do baço de um humano que havia falecido após ter consumido carne bovina crua (Poppe, 1999).

Hoje, porém as aves e seus produtos (ovos e carne) são considerados os principais veiculadores de *Salmonella* Enteritidis para os seres humanos (Bryan & Doyle, 1995).

No passado a *Salmonella* Pullorum e a *Salmonella* Gallinarum eram as principais causadoras de problemas nas aves, porém devido aos programas de erradicação, as mesmas foram praticamente erradicadas (Snoeyenbos & Willians, 19991; Pomeroy & Nagaraja, 1991).

Baumler et al. (2000), postulam que devido à erradicação das mesmas abriu-se um nicho que foi ocupado pela *Salmonella* Enteritidis, uma vez que tanto a *Salmonella* Enteritidis como a *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum pertencem ao sorogrupo D1, indicando uma similaridade de cadeia lipopolissacarídica e que possuem fimbria SEF14, que pode estar envolvida na colonização do tecido reprodutivo, e é encontrada somente em poucos agentes do grupo D (Turcotte & Woodward, 1993).

Vários relatos têm confirmado infecções em aves por *Salmonella* Enteritidis, sendo que esta ampla difusão sugere a transmissão vertical como principal responsável, uma vez que lotes infectados podem passar despercebidos quando não apresentarem sintomatologia e nem efeito na produção de ovos (O'Brien, 1990).

Devido aos prejuízos causados pelas *Salmonella*, passou-se a implementar medidas de controle na avicultura, sendo que dentre estas medidas deve-se ressaltar os seguintes pontos: aves de reposição livres de *Salmonella*, controle de vetores (insetos, pássaros, roedores), higiene e desinfecção adequada das instalações, utilização de rações sem contaminação com *Salmonella*, medidas de biossegurança nas propriedades e monitoramento microbiológico ambiental e das aves.

Agentes antimicrobianos, para medicar lotes de matrizes ou frangos de corte,

também têm sido utilizados, tanto de forma curativa como da forma preventiva, bem como promotor de crescimento. Como exemplo de uso na forma preventiva temos a apreçoada por Goren (1994), que recomenda a combinação da aplicação de medicamentos e microflora intestinal, como ferramenta para controle de *Salmonella* Enteritidis em aves.

Segundo uma série de relatos, situações como esta tem provocado um aumento da resistência a agentes antimicrobianos por parte das *Salmonella*, fato este que tem conduzido a aplicação de princípios como o da precaução pela União Européia, a qual banuiu a utilização de promotores de crescimento com os princípios ativos: avoparcina, virginamicina, espiramicina, tilosina e bacitracina de zinco, bem como do princípio da prova utilizado pelos Estados Unidos (Turnidge, 2004).

Porém, segundo Turnidge (2004), existe uma outra escolha, o princípio do uso prudente, o qual baseia-se em uma compreensão da ecologia da resistência, da transmissão da bactéria resistente e de genes de resistência, da relação entre o uso do antibiótico e aumento da resistência e de um conhecimento de intervenções efetivas.

O presente estudo foi conduzido para avaliar a resistência a agentes antimicrobianos por parte de cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais (suabes de arrasto) de frangos de corte e matrizes pesadas na região Sul, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras bacterianas

O estudo foi conduzido utilizando 79 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambiente (suabes de arrasto) de frangos de corte e matrizes pesadas na região Sul do Brasil, nos anos de 1999 (n: 32), 2000 (n: 28) e 2001 (n: 19). A caracterização antigênica e identificação do sorovar foi realizada pelo Laboratório de Bactérias Entéricas do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Antibiograma

As cepas de *Salmonella* Enteritidis foram submetidas a testes de sensibilidade conforme técnica do NCCLS (2003), com a utilização de discos impregnados com agentes antimicrobianos: Ampicilina 10µg, Ácido Nalidíxico 30µg, Ciprofloxacina 5µg, Cloranfenicol 30µg, Enrofloxacin 5µg, Gentamicina 10µg, Canamicina 30µg,

Nitrofurantoína 300µg, Norfloxacinina 10µg, Polimixina B 300I.U., Estreptomicina 10µg e Tetraciclina 30µg. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa de referência.

RESULTADOS

No presente estudo, os resultados (Tabela 1), indicam que 82,3% (65/79) das cepas de *Salmonella* Enteritidis foram resistentes a um ou mais dos agentes antimicrobianos utilizados e que entre eles, a tetraciclina foi a que teve maior percentagem de cepas resistentes, 67,1% (53/79).

Cepas resistentes em diferentes níveis foram encontradas para ampicilina (1,2%), canamicina (1,2%), ciprofloxacina (2,5%), enrofloxacinina (8,8%), gentamicina (21,5%), estreptomicina (20,2%), nitrofurantoína (26,6%), ácido nalidíxico (30,4%). Nenhuma das cepas de *Salmonella* Enteritidis foi resistente ao cloranfenicol, norfloxacinina e polimixina B.

Dentre as 65 cepas de *Salmonella* Enteritidis que apresentaram resistência, 66,1% (43) apresentaram múltipla resistência, resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos. Vinte e duas cepas (33,8%) foram resistentes a somente um agente antimicrobiano, sendo 16 a tetraciclina, três ao ácido nalidíxico, duas a nitrofurantoína e uma a gentamicina.

Dezenove padrões de resistência foram observados entre as cepas de *Salmonella* Enteritidis (Tabela 2).

DISCUSSÃO

Em medicina veterinária os agentes antimicrobianos são usados de forma terapêutica, metafilática, profilática e como promotores de crescimento (Scharwz et al., 2001). Muitas vezes estes procedimentos levam a um uso indiscriminado, o que favorece a geração de cepas resistentes (Berchieri Júnior et al., 1989).

Segundo Mandall (1995) *apud* Arvanitidon et al. (1998), a utilização de antibióticos na alimentação dos frangos faz com que eles possam excretar cepas de *Salmonella* resistentes.

Dentre os agentes antimicrobianos utilizados no presente estudo, a tetraciclina foi a que apresentou maior percentagem de cepas de *Salmonella* Enteritidis resistentes,

67,1% (53/79). Este dado foi superior aos 15,4% encontrados por Oliveira et al. (2005) em *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, alimentos, carcaças de frango e amostras clínicas e ambientais de criação de aves na região Sul do Brasil, e que os 36% encontrados por Antunes et al., (2003) em *Salmonella* isoladas de produtos de aves no Porto, Portugal, porém menor que os 72,4% obtidos por Cortez et al. (2006) em cepas de *Salmonella* isoladas de abatedouros de aves no Estado de São Paulo e que os 100% obtidos por Ribeiro et al., (2006b) em cepas de *Salmonella* Hadar isolados de carcaças de frango no Rio Grande do Sul, Brasil.

Com relação à estreptomicina, encontramos que 20,2% das *Salmonella* Enteritidis apresentaram resistência. O resultado foi menor que os 39% relatados por Antunes et al. (2003) em Portugal, e que os 25,4% por Bokanyi Júnior et al. (1990) em *Salmonella* isoladas de carcaças e cortes de aves nos Estados Unidos.

Bokanyi Júnior et al., (1990), relataram um padrão de resistência de estreptomicina associada a tetraciclina. No presente estudo, dez cepas de *Salmonella* Enteritidis apresentaram resistência a estreptomicina e a tetraciclina associadas a outros agentes antimicrobianos.

A elevada ocorrência de cepas resistentes a tetraciclina e estreptomicina pode ser explicada pela difusão dos genes de resistência *strA-strB* and *tet(A)*, como observado por Pezzella et al. (2004), em estudo com cepas de *Salmonella* isoladas de animais na Itália.

Baixa resistência a nitrofurantoína foi encontrada, 26,6%, quando comparada com os 95% descritos por Cardoso et al. (2006) em *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frango entre maio de 1995 e abril de 1996, no Rio Grande do Sul, Brasil e com os 52,6% descrito por Ribeiro et al. (2006a) em *Salmonella* isoladas de carcaças de frango na região Nordeste do Brasil.

Resistência aos aminoglicosídeos, gentamicina e canamicina, apresentada pelas cepas de *Salmonella* Enteritidis foram 21,5% e 1,2%, respectivamente. No Canadá, Poppe et al. (1996), em *Salmonella* isoladas de aves, encontraram que somente 7,7% das mesmas apresentaram resistência a gentamicina. Com relação a canamicina, Carramiñana et al. (2004), observaram que 2,8% das *Salmonella* Enteritidis isoladas em um matadouro frigorífico na Espanha, apresentaram resistência.

A resistência as quinolonas é determinada fundamentalmente por mecanismos

mediados por alterações no cromossomo, alteração nos sítios de ligação da DNA *gyrase* e diminuição no acúmulo do agente no interior da bactéria, devido a impermeabilidade da membrana e ou uma expressão acima do normal do sistema de bombas (Pidcock, 2002; Ruiz, 2003)

Elementos móveis que carregam o gene *qnr*, também têm sido descritos como responsáveis por conferir resistência a quinolonas, sendo que estes apresentam um agravante, o fato de terem o potencial de transferir de forma horizontal os genes de resistência (Ruiz, 2003).

Resultados obtidos para o ácido nalidíxico (30,4%), enrofloxacina (8,8%) e ciprofloxacina (2,5%) foram observados, já cepas resistentes a norfloxacina não foram observadas. Estudos recentes tem detectado um aumento de *Salmonella* resistentes as quinolonas na Finlândia (Hakanen et al., 1999), Alemanha (Malorny et al., 1999), Dinamarca (Molbak et al. 2002), Inglaterra e País de Gales (Threlfall et al., 2000) e Espanha (Marinón et al., 2004).

Múltipla resistência, resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos, tem sido observada em muitos estudos de resistência a agentes antimicrobianos por parte das *Salmonella enterica* isoladas de alimentos, humanos e animais. No presente estudo, 67,2% das cepas de *Salmonella Enteritidis* apresentaram múltipla resistência.

Vinte e um diferentes padrões de resistência foram observados entre as 66 cepas de *Salmonella Enteritidis*, sendo que um chama a atenção por ser composto por seis diferentes agentes antimicrobianos, ácido nalidíxico, canamicina, enrofloxaxina, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina.

Baseados nos dados do presente estudo podemos concluir que houve uma elevada percentagem de cepas de *Salmonella Enteritidis* resistente à tetraciclina e com múltipla resistência, que levantamentos contínuos são necessários na indústria avícola e que existe a necessidade de um uso responsável dos agentes antimicrobianos, baseado na compreensão da ecologia da resistência, da transmissão da bactéria resistente e de genes de resistência, da relação entre o uso do antibiótico e aumento da resistência e de um conhecimento de intervenções efetivas (Turnidge, 2004).

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, P., RÉU, C., SOUZA, J.C., et al. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.*, v.82, p.97-1003, 2003.
- ARVANITIDON, M., TSAKRIS, A., SOFIANOU, D., et al. Antimicrobial Resistance and Factor Transfer of *Salmonellae* Isolated from Chicken Carcasses in Greek Hospitals. *Int. J. Food Microbiol.*, v.40, p.197-201, 1998.
- BAUMLER, A.J., HARGIS, B.M., TSOLIS, R.M. Tracing the origins of *Salmonella* Outbreaks. *Science*, v. 287, p. 50-52. 2000.
- BERCHIERI JÚNIOR., A., ADACHI, S.Y., CALZADA, C.T., et al. Farinha de Carne como Fonte de *Salmonella* em Granja avícola. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 9, p. 9-12, 1989.
- BOKANYI JÚNIOR., R.P., STEPHENS, J.F., FOSTER, D.N. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. *Poult. Sci.*, v.69, p.592-598, 1990.
- BRYAN, F.L., DOYLE, M.P. HEALTH Risks and Consequenses of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in Raw Poutry. *J. Food Protec.*, v. 58, n. 3, p. 326-344. 1995.
- CARDOSO, M.O., RIBEIRO, A.R., SANTOS, L.R., et al. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Braz. J. Microbiol.*, v.37, p.299-302, 2006.
- CARRAMIÑANA, J.J., ROTA, C., AGUSTÍN, I., HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet. Microbiol*, v.104, p.133-139, 2004.
- CORTEZ, A.L.L., CARVALHO, A.C.F.B., IKUNO, A.A., et al. Resistência Antimicrobiana de Cepas de *Salmonella* spp. Isoladas de Abatedouros de Aves. *Arq. Inst. Biol.*, v.73, n.2, p.157-163, 2006.
- GOREN, E. Combinación de la Aplicación de Medicamentos y Microflora Intestinal como uma Herramienta em el Tratamiento de lãs Infecciones por *Salmonella enteritidis* em Aves. In: CURSO DE ACTUALIZACION SOBRE EL CONROL Y PREVENCION DE LA INFECCION POR *Salmonella Enteritidis*, 1., 1994, México, D.F. Anais... México: ANECA. 1994. p.13-26.
- HAKANEN, A., SITONEN, A., KOTILAINEM, P., HUOVINEN, P. Increasing fluoroquinolone resistance in *salmonella* seerotyping in Filand during 1995-1997.

- J. Antimicrob. Chemother., v.43, p.145-148, 1999.
- MALORNY, B., SCHROETER, A., HELMUTH, R. Incidence of quinolones resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. Antimicrob. Agents Chemother., v.43, n.9, p.2278-2282, 1999.
- MARIMÓN, J.M., GOMÁRIZ, M., ZIGORRAGA, C., et al. Increasing Prevalence of Quinolone Resistance in Human Nontyphoid *Salmonella enterica* Isolates Obtained in Spain from 1981 to 2003. Antimicrob. Agents Chemother., v.48, p.2789-3793, 2004.
- MOLBAK, K., GERNER-SMIDT, P., WEGERNER, H.C. Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella Enterica* Serotype Enteritidis. Emerging Infec. Dis., v.8, n.5, p.514-515, 2002.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- O'BRIEN, J.D.P. Aspects of *Salmonella enteritidis* control in poultry. World's Poult. Sci. J., v. 46, n. 46, p. 119-124, 1990.
- OLIVEIRA, S.D., FLORES, F.S., SANTOS, L.R., BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food human and poultry-related samples. Int. J. Food Microbiol., v.97, p.297-305, 2005.
- PEZZELLA, C., RICCI, A., DIGIANNATALE, E., LUZZI, I., CARATTOLI, A. Tetracycline and Strptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in *Salmonella enterica* Isolated from Animals in Italy. Antimicrob. Agents Chemother., v.48, n.3, p.903-908, 2004.
- PIDDOCK, L.J.V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from human and food animals. FEMS Microbiol. Rev., v.26, p.3-16, 2002.
- POMEROY, B.S., NAGARAJA, K.V. Fowl Typhoid. In: CALNEK, B.W. (ed.). Diseases of Poultry. 9th. ed. Iowa: Iowa State University Press, Ames. 1991. p.87-99.
- POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals – epidemiology, pathogenesis and control. 1st. ed. Ames: Iowa State University Press, 1999, p. 33-41.
- POPPE, C., MCFADDEN, K.S., DEMCZUK, W.H.B. Drug resistance, plasmids, biotypes and susceptibility to bacteriophages of *Salmonella* isolated from poultry in Canada. Int. J. Food Microbiol., v.30, p.325-344, 1996.

- RIBEIRO, A.R., SILVA, J.V.D., DUARTE, D.A.M., et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* isoladas de carcaças resfriadas de frango. In: CONGRESSO NORTE-NORDESTE DE MULTIRRESISTÊNCIA BACTERIANA, 2., 2006. Recife. Anais... Recife, 2006. Resumo.
- RIBEIRO, A.R., KELLERMANN, A., SANTOS, L.R., et al.. Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Sorovar Hadar Isoladas de Carcaças de Frango. Arq. Inst. Biol., 73, 357-360, 2006.
- RODRIGUE, D.C., TAUXE, R.V., ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? *Epidem. Inf.*, n.105, p.21-27, 1990
- RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.51, p.1109-1117, 2003.
- SCHWARZ, A., KEHRENBURG, C., WASH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Food Microb.*, v.17, p.431-437, 2001.
- SNOEYENBOS, G.H., WILLIAMS, J.E. Salmonellosis. In: CALNEK, B.W. (ed.). *Diseases of Poultry*. 9th. ed. Iowa: Iowa State University Press, Ames. 1991, p. 72-73.
- THRELFALL, E.J., WARD, L.R., SKINNER, J.A., GRAHAM, A. Antimicrobial Drug Resistance in Non-Typhoidal *Salmonellas* from Humans in England and Wales in 1999: Decrease in Multiple Resistance in *Salmonella enterica* Serotypes Typhimurium, Virchow, and Hadar. *Microb. Drug Resist.*, v. 6, p.319-325, 2000.
- TURCOTTE, C., WOODWAED, M.J. Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of gene encoding the SEF 14 fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J. General Microbiol.*, v.139, p.1477-1485, 1993.
- TURNIDGE, J. Antibiotic use in animals – prejudices, perceptions and realities. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.53, p.26-27, 2004.

Tabela 1. Resistência antimicrobiana de 79 cepas de *Salmonella* Enteritidis

Agente Antimicrobiano	Nº (%)
Ácido Nalidíxico	24 (30,4)
Ampicilina	1 (1,2)
Canamicina	1 (1,2)
Cloranfenicol	0
Ciprofloxacina	3 (3,8)
Enrofloxacina	7 (8,8)
Estreptomicina	16 (20,2)
Gentamicina	18 (22,8)
Norfloxacina	0
Nitrofurantoína	21 (26,6)
Polimicina B	0
Tetraciclina	53 (67,1)

Tabela 2. Distribuição dos padrões de resistência das cepas de *Salmonella* Enteritidis

Padrão de resistência	Nº
Sensível	14
GEN	1
NAL	3
NIT	2
TET	16
GEN, STR	2
GEN, TET	1
NAL, TET	5
NIT, TET	13
ENR, NAL, TET	3
GEN, STR, TET	4
GEN, NAL, STR	2
NAL, NIT, TET	3
AMP, GEN, NIT, STR	1
CIP, ENR, NAL, TET	3
GEN, NAL, NIT, STR	1
GEN, NAL, STR, TET	3
GEN, NIT, STR, TET	1
ENR, GEN, KAN, NAL, STR, TET	1

AMP: ampicilina; CIP: ciprofloxacina; CHL: cloranfenicol; ENR: enrofloxacina; GEN: gentamicina; KAN: canamicina; NAL: ácido nalidíxico; NIT: nitrofurantoína; NOR: norfloxacina

CAPÍTULO III

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA EM *Salmonella* ENTERITIDIS ISOLADAS DE CARÇAÇAS DE FRANGO

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *Salmonella* ENTERITIDIS ISOLATED FROM BROILER CHICKEN CARCASSES

Aldemir Reginato Ribeiro^{1,2*}, Dalila Angélica Moliterno Duarte¹, Vladimir Pinheiro do Nascimento²

¹Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/PE. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, CEP 52171-030 - e-mail: mic-lanagro-pe@agricultura.gov.br

²Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA – UFRGS).

RESUMO

A resistência antimicrobiana é um assunto amplamente estudado em todos os gêneros bacterianos, sobretudo em relação aos responsáveis por zoonoses, como o caso da *Salmonella*, a qual merece especial atenção, já que pode ser transmitida para os seres humanos. O presente estudo foi conduzido para verificar a ocorrência de resistência a agentes antimicrobianos em 17 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças resfriadas de frango no Estado de Pernambuco, no período de março de 2004 a dezembro de 2005. No presente estudo, os resultados indicaram que 94,1% das cepas de *Salmonella* Enteritidis apresentaram resistência a nitrofurantoína, tendo também apresentado resistência em diferentes níveis ao ácido nalidíxico (23,5%), estreptomicina (17,6%), canamicina (5,9%), enrofloxacina (5,9%) e a tetraciclina (5,9%). Todas as cepas de *Salmonella* Enteritidis apresentaram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos utilizados, com sete diferentes padrões de resistência. Os níveis de resistência observados enfatizam a necessidade do uso responsável dos agentes antimicrobianos na produção animal.

Palavras Chave: *Salmonella* Enteritidis, resistência antimicrobiana, carcaças de frango

ABSTRACT

ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN *Salmonella* ENTERITIDIS ISOLATED FROM BROILER CHICKEN CARCASSES

Antimicrobial resistance is a widely studied issue in all bacterial genera, but in the case of those responsible for zoonotic illnesses, like *Salmonella*, they merit special attention, because it can be transmitted via foodstuffs to human beings. The present study was carried out to verify the occurrence of antimicrobial resistance in 17 samples of *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler chicken carcasses in the State of Pernambuco, Brazil, from March 2004 to December 2005. In the present study, the results indicated that 94.1% of the *Salmonella* Enteritidis isolates were resistant to nitrofurantoin, while intermediate resistance was observed at different levels to nalidixic acid (23.5%), streptomycin (17.6%), kanamycin (5.9%), enrofloxacin (5.9%) and tetracycline (5.9%). All isolates were resistant to at least one antimicrobial agent, with seven different patterns of resistance. These levels of resistance highlight the need for responsible use of antimicrobial agents in animal production.

Key Words: *Salmonella* Enteritidis, antimicrobial resistance, broiler chicken carcasses

A resistência antimicrobiana tem se constituído num assunto amplamente estudado em todos gêneros bacterianos, sendo que, no caso dos responsáveis por zoonoses merece especial atenção, pois pode ser transmitida via alimentos para os seres humanos (AARESTRUP, 1999).

Dentre os agentes bacterianos responsáveis por zoonoses, temos os do gênero *Salmonella*, constituído por 2.523 sorovares (POPOFF et al., 2003) e entre estes, o sorovar Enteritidis tem merecido atenção, uma vez que tem sido o mais isolado em infecções humanas (HERIKSTAD et al., 2002).

A *Salmonella* Enteritidis também tem sido isolada em aves no Brasil (SOLARI et al., 1997), bem como em carcaças de aves e seus produtos (SANTOS et al., 2000).

O presente estudo foi conduzido com a finalidade de avaliar a resistência a agentes antimicrobianos de 17 amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças resfriadas de frango no período de março de 2004 a dezembro de 2005, no Estado de Pernambuco, sendo este o sorovar mais isolado no período, representando 28,8% do total de isolados.

As amostras de *Salmonella* Enteritidis foram submetidas a testes de sensibilidade conforme técnica do NCCLS (2003), com a utilização de discos impregnados com antibióticos: ácido nalidíxico 30µg, ampicilina 10µg, amoxicilina/ácido clavulônico 3µg, canamicina 30µg, cefotaxina 30µg, ciprofloxacina 5µg, cloranfenicol 30µg, enrofloxacina 5µg, Estreptomicina 10µg, gentamicina 10µg, nitrofurantoína 300µg, norfloxacina 10µg, polimixina B 300I.U., e tetraciclina 30µg. *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como cepa de referência.

No presente estudo, 100% (Tabela 1) das cepas de *Salmonella* Enteritidis apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano, com sete diferentes padrões de resistência. Este dado é maior que os 58,1% observados na Grécia (ARVANITIDOU et al., 1998), 67,3% nos Estados Unidos (BOKANYI JÚNIOR et al., 1990) e 75% em Portugal (ANTUNES et al., 2003).

As amostras de *S. Enteritidis* testadas apresentaram 94,1% de resistência a nitrofurantoína (Tabela 2), dado este semelhante aos obtidos por Cardoso et al., (2006) em *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango no Rio Grande do Sul.

Resistência ao ácido nalidíxico (23,5%) e a enrofloxacina (5,9%) é preocupante, uma vez que a resistência as quinolonas tem mecanismos mediados por cromossomo

(PIDDOCK, 2002).

Com relação a estreptomicina (17,6%), os resultados demonstraram dados de resistência menores que os encontrado por ANTUNES et al (2003) em Portugal (39%) e que nos Estados Unidos (15,4%) (BOKANYI JÚNIOR et al., 1990).

O nível de resistência observado para a tetraciclina (5,9%) foi menor que os 15,4% encontrados por OLIVEIRA et al. (2005) em *S. Enteritidis* isoladas de humanos, alimentos, carcaças de frango e amostras clínicas e ambientais de criação de aves na região Sul do Brasil e que os 72,4% obtidos por CORTEZ et al. (2006) em cepas de *Salmonella* isoladas de abatedouros de aves no Estado de São Paulo, Brasil.

Resistência a canamicina (5,9%) também foi observada.

Todas as 17 cepas de *S. Enteritidis* foram sensíveis a ampicilina, amoxicilina/ácido clavulônico, cefotaxina, ciprofloxacina, cloranfenicol, norfloxacin, gentamicina e polimixina B

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que 100% das cepas de *S. Enteritidis* apresentaram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano, fato este que enfatiza a necessidade do uso prudente e criterioso dos mesmos na produção animal.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.12, p.279-285, 1999.
- ANTUNES, P., RÉU, C., SOUZA, J.C., PEIXE, L., PESTANA, N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *International Journal of Food Microbiology*, v.82, p.97-1003, 2003.
- ARVANITIDOU, M., TSAKRIS, A., SOFIANOU, D., KATSOUYANNOPOULOS, V. Antimicrobial resistance and R-factor transfer of salmonellae isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. *International Journal of Food Microbiology*, v. 40, p. 197-201, 1998.
- BOKANYI JR., R.P., STEPHENS, J.F., FOSTER, D.N. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. *Poultry Science*, v.69, p.592-598, 1990.
- CARDOSO, M.O., RIBEIRO, A.R., SANTOS, L.R., PILOTTO, F., MORAES, H.L.S., SALLE, C.T.P., ROCHA, S.L.S., NASCIMENTO, V.P. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.368-371, 2006.
- CORTEZ, A.L.L., CARVALHO, A.C.F.B., IKUNO, A.A., BÜRGER, K.P., VIDAL-MARTINS, A.M.C. Resistência Antimicrobiana de Cepas de *Salmonella* spp. Isoladas de Abatedouros de Aves. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 73, p. 157-163, 2006.
- HERIKSTAD, H., MOTARJEMI, Y., TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiology Infection*, v.129, p.1-8, 2002.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.
- OLIVEIRA, S.D., FLORES, S.F., SANTOS, L.R., BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology*, v. 97, p. 297-305, 2005.
- PIDDOCK, L.J.V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiology Review*, v. 26, p. 3-16, 2002.
- POPOFF, M.Y., BOCKEMUHL, J., GHEESLING, L.L. Supplement 2001(no 45) to the Kauffmann – White scheme. *Research in Microbiology*, v.154, p. 173-174, 2003.
- SANTOS, S.M.S., BERCHIERI JÚNIOR, A., FERNANDES, S.A., TAVECHIO, A.T., AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 20, p. 39-42, 2000.
- SOLARI, C.A., REIS, E.M.F., COSTA, R.G., FEITOSA, D.P., RODRIGUES, D.P., HOFER, E. Caracterização dos sorovares de *Salmonella* isoladas de aves de diferentes estados no quinquênio 1992-96. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA. 19, 1997. Rio de Janeiro. Anais. Rio de Janeiro, RJ: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p.126.

Tabela 1. Distribuição dos padrões de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* Enteritidis

Padrões de Resistência	Nº de cepas
EST	1
NIT	9
EST, NIT	1
NAL, NIT	3
NIT, TET	1
CAN, EST, NIT	1
ENR, NAL, NIT	1

CAN: canamicina; EST: estreptomicina; ENR: enrofloxacina; NAL: ácido nalidíxico; NIT: nitrofurantoína; TET: tetraciclina

Tabela 2. Resistência antimicrobiana das 17 cepas de *Salmonella* Enteritidis

Agente Antimicrobiano	Número (%) de isolados resistentes
Nitrofurantoína	16 (94,1)
Ácido Nalidíxico	4 (23,5)
Estreptomicina	3 (17,6)
Canamicina	1 (5,9)
Enrofloxacina	1 (5,9)
Tetraciclina	1 (5,9)
Ampicilina	0
Amoxicilina/Ácido Clavulônico	0
Cefotaxina	0
Cloranfenicol	0
Ciprofloxacina	0
Gentamicina	0
Norfloxacina	0
Polimicina B	0

CAPÍTULO IV

**DETECÇÃO DE MUTAÇÃO NO GENE *gyrA* DE *Salmonella* ENTERITIDIS
RESISTENTES AO ÁCIDO NALIDÍXICO**

**DETECTION OF MUTATIONS IN THE *gyrA* GENE FROM NALIDIXIC ACID
RESISTANT *Salmonella* ENTERITIDIS**

Aldemir Reginato Ribeiro^{1*}, Manoel Adrião Gomes Filho², Madriano Christilis R.
Santos², Vladimir Pinheiro do Nascimento¹

¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA – UFRGS), Rua Bento Gonçalves, 8824, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: aldemir_r@yahoo.com

² Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

RESUMO

O presente estudo foi conduzido com o propósito de detectar mutação no gene *gyrA* cepas de *Salmonella* Enteritidis resistentes ao ácido nalidíxico isoladas nas regiões Nordeste e Sul do Brasil. Os resultados indicam que 69% (29/42) das cepas de *Salmonella* Enteritidis, resistentes ao ácido nalidíxico, apresentaram algum tipo de mutação no gene *gyrA* da região determinante de resistência a quinolonas. As alterações gênicas ocorreram nos aminoácidos dos codons Gly-81 (3,5%), Asp-82 (3,5%), Ser-83 (31%) ou Asp-87 (62%). As mutações continham alterações de Gly para Asp (n = 1) no codon 81, Asp para Asn (n: 1) no codon 82, Ser para Phe (n: 9) no codon 83 e Asp para Tyr (n: 9) ou Asn (n: 9) no codon 87. Das nove cepas de *S. Enteritidis* que apresentaram mutação no codon Ser-83 para Phe, seis, além de apresentarem resistência ao ácido nalidíxico, também apresentavam resistência a enrofloxacina. Em conclusão, observamos que, assim como em outros trabalhos amostras de *S. Enteritidis* resistentes ao ácido nalidíxico, isoladas no Brasil, também apresentam mutação no gene *gyrA*, da região determinante de resistência a quinolonas; que a mutação predominante foi a que ocorreu no condon Asp-87; e que 66,6% das cepas que apresentaram mutação no condon Ser-83 para Phe, apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e a enrofloxacina.

Palavras Chave: *Salmonella* Enteritidis, Resistência Antimicrobiana, *gyrA*

ABSTRACT

DETECTION OF MUTATIONS IN THE *gyrA* GENE FROM NALIDIXIC ACID RESISTANT *Salmonella* ENTERITIDIS

The present study was carried out to detect mutations in the *gyrA* gene from nalidixic acid resistant *Salmonella* Enteritidis isolated in Southern and Northeastern Brazil. Among 42 *S. Enteritidis*, 69% (29) showed at least one mutation in *gyrA* genes in the quinolone resistance determining region (QRDR), in the codons corresponding to Gly-81 (3,5%), Asp-82 (3,5%), Ser-83 (31%) or Asp-87 (62%). These mutants presented a substitution of Gly for Asp (n = 1) at codon 81, Asp for Asn (n: 1) at codon 82, Ser for Phe (n = 9) at codon 83 and Asp for Tyr (n: 9) or Asn (n: 9) at codon 87. Among the nine *S. Enteritidis* that showed a substitution from Ser for Phe at codon 83, six showed enrofloxacin resistance. In conclusion, *Salmonella* Enteritidis nalidixic acid resistant isolated in Southern and Northeastern Brazil showed mutation in the *gyrA* gene of QRDR, the most prevalent mutation occurred in codon 87, and 66,6% of the *S. Enteritidis* that contained change from Ser to Phe in codon 83 were resistant to nalidixic acid and enrofloxacin.

Key words: *gyrA*, *Salmonella* Enteritidis, antimicrobial resistance, nalidixic acid

INTRODUÇÃO

As quinolonas são um grupo de agentes antimicrobianos sintéticos que surgiram no início da década de 60, quando durante o processo de síntese da cloroquina, agente para tratamento da malária, chegou-se ao ácido nalidíxico. Na década de 80, a partir da adição de um átomo de flúor na posição seis da molécula da quinolona, surgiram as fluoroquinolonas (Tortora *et al.*, 2000; Ruiz, 2003).

Este grupo de agentes antimicrobianos atua na topoisomerase II, DNA gyrase e topoisomerase IV. A DNA gyrase, é composta por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e tem como função catalizar o super enrolamento negativo do DNA, ou seja, são essenciais para a manutenção da topologia do DNA (Horowitz & Wang, 1987).

A topoisomerase IV, também é um tetrâmero composto por duas subunidades C e duas subunidades E, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, cuja principal função é a separação dos cromossomos das células filhas no processo de replicação (Peng & Marians, 1993).

O local de atuação das quinolonas difere nos microrganismos Gram negativos e nos Gram positivos. Nas bactérias Gram negativas, o alvo é a DNA gyrase, enquanto nas Gram positivas é a topoisomerase IV (Ruiz, 2003).

Estudos recentes tem relatado um aumento de resistência a quinolonas em isolados do gênero *Salmonella* provenientes da Alemanha (Malorny, *et al.*, 1999), Finlândia (Hakenen, *et al.*, 1999), Inglaterra e País de Gales (Threlfall *et al.*, 2000), Dinamarca (Molbak, *et al.*, 2002), Espanha (Marimón, *et al.*, 2004), Coréia (Choi *et al.*, 2005) e Brasil (Ribeiro *et al.*, 2006), sendo que em alguns casos os autores relacionam tal fato à liberação, por parte dos órgãos competentes pela área de medicamentos dos seus respectivos países, das quinolonas para uso na produção animal.

A resistência as quinolonas é determinada fundamentalmente por alterações no cromossomo, alteração nos sítios de ligação da DNA gyrase e diminuição no acúmulo do princípio ativo no interior da bactéria, devido à impermeabilidade da membrana e ou da expressão acima do normal do sistema de bombas (Piddock, 2002; Ruiz, 2003).

A presença de uma mutação simples em uma das posições da região determinante de resistência a quinolonas, localizada entre os aminoácidos Ala67 – Gln106 da *gyrA*, normalmente resulta em um nível elevado de resistência ao ácido nalidíxico, sendo que

em *Salmonella* as mutações mais comuns ocorrem na Ser-83 ou no Asp-87, as quais podem ser simples ou dupla (Pidcock, 2002; Ruiz, 2003), porém alterações a nível da Gly-81 e Asp 82, também já foram relatadas (Reyna *et al.*, 1995; Levy *et al.*, 2004).

O presente estudo foi conduzido com o propósito de detectar mutação no gene *gyrA* em cepas de *Salmonella* Enteritidis resistentes ao ácido nalidíxico isoladas nas regiões Nordeste e Sul do Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras bacterianas

O estudo foi conduzido utilizando 42 cepas de *Salmonella* Enteritidis que se apresentaram resistentes ao ácido nalidíxico ao serem submetidas a teste de sensibilidade conforme técnica do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, outrora NCCLS) (2003), com a utilização de discos impregnado com o agente antimicrobiano, sendo 24 isoladas de amostras clínicas e ambiente (*swabs* de arrasto) de frangos de corte e matrizes pesadas na região Sul do Brasil, nos anos de 1999, 2000 e 2001, 14 isoladas de cortes de frango na região Sul do Brasil, no ano de 1996 e 4 isoladas de carcaças de frango na região Nordeste do Brasil, nos anos de 2004 e 2005.

Amplificação da região determinante de resistência a quinolonas do gene *gyrA*

Para a extração de DNA, utilizou-se alíquota de meio de cultivo não seletivo (TSB), incubado a 37°C por 18 horas. Coletou-se 1mL de TSB em microtubos com capacidade para 1,5mL e imediatamente centrifugou-se durante 4 minutos a 5000g, em uma microcentrífuga Sigma modelo 2K15 a temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se ao sedimento 1mL de TE (Tris, 10mM - Invitrogen Life TechnologiesTM e EDTA, 1mM pH 8,0 - Sigma Chemical Co). Homogeneizou-se 10 segundos em um agitador de tubos (Phoenix) e repetiu-se duas vezes o processo de centrifugação. Acrescentou-se 100µL de TE e 100µL de fenol (Merck) equilibrado pH 8,0 e realizou-se a extração pelo método do fenol-clorórmio (Maniatis *et al.*, 1989).

O gene *gyrA* foi amplificado por reação em cadeia da polimerase com os *primers* *STgyrA P1* (5'-TGTCGAGATGGCCTGAAGC-3') e *StgyrA P2BIO* (5'-TACCGTCATAGTTATCCACGC-3'), descritos por Griggs *et al.* (1996).

A reação em cadeia da polimerase foi realizada em volume total de 25µL,

constituído por 2,5µL de tampão concentrado 10 vezes (500mM de KCl, 200mM de Tris HCl pH 8,4; InvitrogenTM); 1µL de cloreto de magnésio (50mM MgCl₂; InvitrogenTM); 1µL (20 pmol de cada *primer* separadamente); 2,5µL da solução de dNTP (5mM; GibcoBRL); 0,2µL de *Taq* DNA polimerase 5U/µL(InvitrogenTM); 3µL de amostra de DNA; e 13,8µL água ultra pura.

As amplificações foram realizadas em um termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) com capacidade para 25 amostras. Os ciclos constaram de uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida por 30 ciclos com desnaturação (94°C/1 minuto), anelamento (55°C/1 minuto) e extensão (72°C/1 minuto), e uma extensão final de 72°C por 5 minutos (Lee *et al.*, 2004).

Após a realização da reação em cadeia da polimerase as amostras foram submetidas a eletroforese à 80 V (Gel Electrophoresis Apparatus GNA 100, Pharmacia) em gel de agarose 2% corado com 0,3µL de brometo de etídeo (GibcoBRL) em tampão de TBE (45mM Tris borato, 1mM EDTA pH 8,0).

Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta (Pharmacia LKB Macrovue), comparando-se os produtos de amplificação com padrões de peso molecular com escala de 50 bp (50 bp DNA ladder, InvitrogenTM).

O produto da reação em cadeia da polimerase foi purificada usando kit de purificação *PureLinkTM PCR Purification* (InvitrogenTM) e o produto final foi encaminhado para o Centro de Estudos do Genoma Humano –USP, para sequenciamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados (Tabela 1), indicam que 69% (29/42) das cepas de *Salmonella* Enteritidis, resistentes ao ácido nalidíxico, apresentaram algum tipo de mutação no gene *gyrA* na região determinante de resistência a quinolonas. As alterações gênicas ocorreram nos aminoácidos dos codons Gly-81 (3,5%), Asp-82 (3,5%), Ser-83 (31%) ou Asp-87 (62%). Uma amostra apresentou uma inclusão de uma prolina entre os codons 56 e 57, apresentando um deslocamento de todo o restante da seqüência de aminoácidos.

As mutações continham alterações de Gly para Asp (n: 1) no codon 81, Asp para Asn (n:1) no codon 82, Ser para Phe (n: 9) no codon 83 e Asp para Tyr (n: 9) ou Asn (n: 9) no codon 87. Das nove cepas de *S. Enteritidis* que apresentaram mutação no codon

Ser-83 para Phe, seis, além de apresentarem resistência ao ácido nalidíxico, também apresentavam resistência a enrofloxacina.

Mutações nos condons Ser-83 (31%) e Asp-87 (62%) foram as mais comuns. Estudo realizado por Giraud *et al.* (1999), sugerem que as mutações nos codons Ser-83 e Asp-87 do gene *gyrA* não são igualmente distribuídas entre os diferentes sorovares. Os sorovares Newport, Virchow e Typhimurium apresentaram mutação prevalente no codon Ser-83, já nos sorovares Hadar e Kottbus a mutação que prevaleceu foi no codon Asp-87.

Salmonella Enteritidis resistentes ao ácido nalidíxico, isoladas na Espanha, apresentaram uma frequência maior de mutação no codon Asp-87 (86,6%), enquanto somente 13,4% das cepas apresentaram mutação no codon Ser-83 (Soto *et al.*, 2003).

Piddock *et al.* (1998), utilizando cepas de *Salmonella* isoladas de animais no Reino Unido, observaram que 80,6% das cepas apresentaram mutação no codon Asp-87, 16,8% no codon Ser-83 e 2,6%, uma mutação chamada pelos autores de *wild-type*. Neste estudo, porém, muitas *S. Enteritidis* isoladas de um lote de aves em uma propriedade que estava utilizando enrofloxacina apresentaram mutação no codon 83, Ser para Phe.

Por sua vez Liebana *et al.* (2002), observaram uma distribuição de mutação no *gyrA* mais equilibrada nos codons 83 (50,5%) e 87 (49,5%), utilizando-se de um painel de *Salmonella enterica* resistentes ao ácido nalidíxico isoladas de animais na Inglaterra e País de Gales.

San Matín *et al.* (2005), encontram mutação de 65,7% e 34,3%, nos codons Ser-83 e Asp-87, respectivamente, em *Salmonellae* isoladas de aves no Chile.

Mutações nos condons Gly-81 tem sido relatadas, apresentando alteração para Ser, Cys, His e Asn (Reyna *et al.*, 1995; Giraud *et al.*, 1999; Lindsted & Kapperud, 2004; Levy *et al.*, 2004), bem como no codon Asp-82 para Asn (Levy *et al.*, 2004), sendo que estas mutações apresentam-se com menor frequência.

Com relação ao tipo de substituição de aminoácidos que as mutações podem apresentar, as mesmas também podem variar de acordo com o sorovar, sendo que no caso da *S. Enteritidis* no codon Ser-83 pode ocorrer substituição tanto por uma Phe como por uma Tyr e no codon Asp-87 podem ocorrer três tipos de substituição, Asn, Gly e Tyr ao contrário de outros sorovares como a *S. Typhimurium* que no codon Ser-83

muta para Phe e no Asn-87 para Asn ou Tyr e as *S. Montevideo*. e *S. Hadar* que apresentam somente mutação de Ser-83 para Tyr e de Asp-87 para Asn (Eaves *et al.*, 2004).

Doze das 42 (28,6%) cepas de *Salmonella* Enteritidis não apresentaram nenhum tipo de mutação. É possível que estas cepas tenham desenvolvido algum outro mecanismo de resistência ao ácido nalídico, como diminuição no acúmulo do agente no interior da bactéria, devido à impermeabilidade da membrana e ou da expressão acima do normal do sistema de bombas (Piddock, 2002; Ruiz, 2003), bem como mutações nos genes *gyrB*, *parC* ou *parE* (Hopkins *et al.*, 2005).

Elementos móveis que carregam o gene *qnr*, também tem sido descritos como responsáveis por conferir resistência a quinolonas, sendo que estes apresentam um agravante, o fato de terem o potencial de transferir de forma horizontal os genes de resistência (Ruiz, 2003).

Em conclusão, observamos que, assim como em outros trabalhos amostras de *S. Enteritidis* resistentes ao ácido nalidíxico, isoladas no Brasil, também apresentam mutação no gene *gyrA*, da região determinante de resistência a quinolonas; que a mutação predominante foi a que ocorreu no condon Asp-87; e que 66,6% das cepas que apresentaram mutação de Ser para Phe no codon 83, apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e a enrofloxacina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choi, S.H., Wood, J.H., Lee, J.E., Park, S.J., Choo, E.J., Kwark, Y.G., Kim, M.N., Choi, M.S., Lee, N.Y., Lee, B.K., Kim, N.J., Jeong, J.Y., Ryu, J., Kim, Y.S. (2005). Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.56, p. 1111-1114.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, formerly NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards). (2003) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS Document M2-A8. Wayne, Pennsylvania, USA.
3. Eaves, D.J., Randall, L., Gray, D.T., Buckley, A., Woodward, M.J., White, A.P., Piddock, L.J.V. (2004). Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* and Association with Antibiotic Resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 4012-4015.
4. Giraud, E., Brisabois, A., Martel, J.L., Chaslus-Dancla, E. (1999). Comparative Studies of Mutations in Animal Isolates and Experimental In Vitro- and In Vivo-Selected Mutants of *Salmonella* spp. Suggest a Counterselection of Highly Fluoroquinolone-Resistant Strains in the Field. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 2131-2137.
5. Griggs, D.J., Gensberg, K., Piddock, L.J.V. (1996). Mutations in *gyrA* Gene of Quinolone-Resistant *Salmonella* Serotypes Isolated from Humans and Animals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 40, p. 1009-1013.
6. Hakanen, A., Sitonen, A., Kotilainen, P., Huovinen, P. (1999). Increasing fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serotyping in Finland during 1995-1997. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.43, p.145-148.
7. Hopkins, K.L., Davies, R.H., Threlfall, E.J. (2005). Mechanism of quinolone resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 25, p. 358-373.
8. Horowitz, D.S., Wang, J.C. (1987). Mapping the Active Site Tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 5339-5244.
9. Lee, Y.J., Kim, K.S., Kim, J.H., Tak, R.B. (2004). *Salmonella gallinarum gyrA* mutations associated with fluoroquinolone resistance. *Avian Pathol.*, v. 33, p. 251-257.
10. Levy, D.A., Sharma, B., Cebula, T.A. (2004). Single-Nucleotide Polymorphism Mutation Spectra and Resistance to Quinolone in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis with a Mutator Phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48, p. 2355-2363.
11. Liebana, E., Clouting, C., Cassar C.A., Randal, L.P., Walker, R.A., Threlfall, E.J., Clifton-Hadley, F.A., Ridley, A.M., Davies, R.H. (2002). Comparison of *gyrA* Mutations, Cyclohexane Resistance, and the Presence of Class I Integrons in *Salmonella enterica* from Farm Animals in England and Wales. *J. Clin. Microbiol.*, v. 40, p. 1481-1486.
12. Lindsted, B.A., Kapperud, G. (2004). Geographically dependent distribution of *gyrA* gene mutations at codons 83 and 87 in *Salmonella* Hadar, and a novel codon Gly to His mutation in *Salmonella* Enteritidis. *APMIS*, v. 112, p. 165-171.
13. Malorny, B., Schroeter, A., Helmuth, R. (1999). Incidence of quinolones

- resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.43, p.2278-2282.
14. Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (Eds.) *Molecular Cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
 15. Marimón, J.M., Gomáriz, M., Zigorraga, C., Cilla, G., Pérez-Trallero, E. (2004). Increasing Prevalence of Quinolone Resistance in Human Nontyphoid *Salmonella enterica* Isolates Obtained in Spain from 1981 to 2003. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.48, p.2789-3793.
 16. Molbak, K., Gerner-Smidt, P., Wegerner, H.C. (2002). Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella Enterica* Serotype Enteritidis. *Emerging Infec. Dis.*, v.8, n.5, p.514-515.
 17. Peng, H., Marians, K.J. (1993). *Escherichia coli* Topoisomerase IV, Purification, Characterization, Subunits Structure, and Subunits Interactions. *J. Biol. Chem.*, v. 268, p. 24481-24490.
 18. Piddock, L.J.V., Ricci, V., McLaren, I., Griggs, D.J. (1998). Role of mutation in the *gyrA* and *parC* genes of nalidixic-acid-resistant *Salmonella* serotypes isolated from animals in the United Kingdom. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 41, p. 635-641.
 19. Piddock, L.J.V. (2002). Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from human and food animals. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.26, p.3-16.
 20. Reyna, F., Huesca, M., González, V., Fuchs, Y. (1995). *Salmonella typhimurium gyrA* Mutations Associated with Fluoroquinolone Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 39, p. 1621-1623.
 21. Ribeiro, A.R., Kellermann, A., Santos, L.R., Fittél, A.P., Nascimento, V.P. (2006). Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Sorovar Hadar Isoladas de Carcaças de Frango. *Arq. Inst. Biol.*, 73, 357-360.
 22. Ruiz, J. (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.51, p.1109-1117.
 23. San Martín, B., Lapierre, L., Toro, C., Bravo, V., Cornejo, J., Hormazabal, J.C., Borie, C. (2005). Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. *Vet. Microbiol.*, v. 110, p. 239-244.
 24. Soto, S.M., González-Hevia, A., Mendoza, M.C. (2003). Antimicrobial resistance in clinical isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: relationships between mutation conferring quinolone resistance, integrons, plasmids and genetic types. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.51, p.1287-1291.
 25. Threlfall, E.J., Ward, L.R., Skinner, J.A., Graham, A. (2000). Antimicrobial Drug Resistance in Non-Typhoidal *Salmonellas* from Humans in England and Wales in 1999: Decrease in Multiple Resistance in *Salmonella enterica* Serotypes Typhimurium, Virchow, and Hadar. *Microb. Drug Resist.*, v. 6, p.319-325.
 26. Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. *Drogas Antimicrobianas*. In: Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. ed., *Microbiologia*. 6 ed. Rio Grande do Sul: Artmed Editora S.A. 2000, p.531-556.

Tabela 1. Distribuição das mutações no gene *gyrA*

Mutação no gene <i>gyrA</i>	n° de isolados (%)
Gly 83 → Asp	1 (3,5)
Asp 82 → Asn	1 (3,5)
Ser 83 → Phe	9 (31,0)
Asp 87 → Tyr	9 (31,0)
Asp 87 → Asn	9 (31,0)

CAPÍTULO V

FAGOTIPOS DE *Salmonella* ENTERITIDIS ISOLADAS DE AMOSTRAS CLÍNICAS E DO AMBIENTE CRIATÓRIO DE AVES E DE CARÇAÇAS DE FRANGO

PHAGE TYPES OF *Samonella* ENTERITIDIS ISOLATED FROM POULTRY FLOCKS, POULTRY ENVIRONMENTAL AND BROILER CHICKEN CARCASSES

Aldemir Reginato Ribeiro^{1,2*}, Dalila Angélica Moliterno Duarte², Eliane Moura Falavina dos Reis³, Christiane Soares Pereira³, Vladimir Pinheiro do Nascimento¹

¹Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CDPA – UFRGS), Rua Bento Gonçalves, 8824, CEP 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

²Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária, Laboratório Nacional Agropecuário (MAPA – LANAGRO), Recife, PE, Brasil.

³Depto Bacteriologia, Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

*Corresponding author: E-mail: aldemir_r@yahoo.com

RESUMO

O presente estudo foi conduzido para identificar os fagotipos de *Salmonella* Enteritidis isoladas no Sul do Brasil, nos anos de 1999, 2000 e 2001, de aves e de seu ambiente criatório e no nordeste do Brasil, nos anos de 2004 e 2005, de carcaças de frango. A fagotipificação das 95 cepas de *Salmonella* Enteritidis utilizadas no presente estudo apresentou que 63,1% (60/95) pertencem ao fagotipo (FT) 4, 18,9% (18/95) ao FT 4a, 14,7% (14/95) ao FT 1, 1,1% (1/95) ao FT 6, 1,1% ao FT 6a, e 1,1% ao FT 7a. Os resultados demonstraram que o fagotipo 4 é o predominante.

Palavras Chaves: *Salmonella* Enteritidis, fagotipagem, aves, carcaças de frango

ABSTRACT

PHAGE TYPES OF *Samonella* ENTERITIDIS ISOLATED FROM POULTRY FLOCKS, POULTRY ENVIRONMENTAL AND BROILER CHICKEN CARCASSES

The present study was carried out to identify the phage types of *Salmonella* Enteritidis isolates from poultry, poultry environmental (environmental swabs) in Southern Brazil, and broiler chicken carcasses isolated in Northeastern Brazil. Phage typing differentiated the 95 isolates in six types. From 95, 63.1% belonged to the phage type (PT) 4, 18.9% to the PT 4a, 14.7% to the PT 1, 1.1% to the PT 6, 1.1% to the PT 6a and 1.1% to the PT 7a. *Salmonella* Enteritidis phage type (PT) 4 was the most common.

Key Words: *Salmonella* Enteritidis, Phage Type, poultry, broiler chicken carcasses

INTRODUÇÃO

Salmonella Enteritidis é uma importante causa de salmonelose humana no mundo (Herikstad *et al.*, 2002). No Brasil, *Salmonella* Enteritidis, tem sido o sorovar mais isolado em infecções humanas (Fernandes *et al.*, 2006) e em fontes não humanas, que incluem carcaças de aves (Santos *et al.*, 2000), gêneros alimentícios, animais, meio ambiente, água, água de esgotos, ração animal, vísceras, fezes, fontes não conhecidas (Tavechio *et al.*, 2002) e lotes de aves (Kanashiro *et al.*, 2005).

O estudo epidemiológico de *Salmonella* Enteritidis demanda métodos de tipificação, dentre os quais temos a fagotipificação, a qual baseia-se no emprego de bacteriófagos ou fagos, que podem infectar determinadas bactérias, gerando um padrão de lise que divide uma espécie bacteriana em fago-resistentes ou fago-sensíveis (Anderson & Williams, 1956). Esta habilidade dos fagos para distinguir variedades entre *Salmonellae* de um mesmo serovar fez com que houvesse uma aceitação e desenvolvimento da fagotipificação como ferramenta nas caracterizações epidemiológicas (Gershman, 1976).

Após tentativas realizadas por Gershman (1976) e Alonso *et al.*, (1987), para estabelecer um esquema de fagotipificação para *Salmonella* Enteritidis, Ward *et al.*, (1987), estabeleceram um esquema de fagotipificação que demonstrou alto grau de discriminação entre as cepas testadas.

O presente estudo foi conduzido para identificar o fagotipo (FT) de *Salmonella* Enteritidis isoladas de cortes e carcaças de frango nas Regiões Sul e Nordeste do Brasil, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras Bacterianas

Foram utilizadas noventa e cinco cepas de *Salmonella* Enteritidis, sendo 78 isoladas de amostras clínicas e do ambiente criatório (*swab* de arrasto) de aves, nos anos de 1999, 2000 e 2001, na região sul e 17 isoladas de carcaças resfriadas de frango, nos anos de 2004 e 2005, na região nordeste.

Fagotipagem

A fagotipificação das cepas de *Salmonella* Enteritidis foi realizada no Instituto

Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, utilizando-se o sistema adaptado de Ward *et al.* (1987).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fagotipificação das 95 cepas de *Salmonella* Enteritidis no presente estudo demonstraram que 63,1% (60/95) pertencem ao fagotipo (FT) 4, 18,9% (18/95) ao FT 4a, 14,7% (14/95) ao FT 1, 1,1% (1/95) ao FT6, 1,1% ao FT 6a, e 1,1% ao FT 7a (Tabela 1).

A predominância da *Salmonella* Enteritidis FT 4 nos isolados utilizados está em concordância com outros publicados mundialmente. Na Itália durante no período de 1982 a 1992 o isolamento de *Salmonella* Enteritidis em humanos aumentou de 2,4% para 57,1% e de alimentos de 0,5% para 22,8%, tendo o FT 4 como o predominante (Fantasia & Filetici, 1994).

Na Holanda, Van Duijkeren *et al.* (2002) observaram que entre as *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos e aves de 1984 a 2001, o FT 4 foi o predominante, seguido pelo FT 21, FT 28, FT 1 e FT 6. De acordo com Schoeter *et al.* (1994) o FT 4 também é o que predomina na Alemanha.

No Brasil, Fernandes *et al.* (2003) observaram que a partir de 1993 a *Salmonella* Enteritidis FT 4 suplantou o FT 8 que até então era o predominante, fato este corroborado por estudos posteriores (Santos *et al.*, 2003; Nunes *et al.* 2003).

Quando levamos em consideração a origem dos isolados, observamos que em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais (*swab* de arrasto) de aves da região sul nos anos de 1999, 2000 e 2001, 56,4% pertencem ao FT 4, 21,8% ao FT 4a, 17,9% ao FT 1, 1,3% ao FT 6, 1,3% ao FT 6a e 1,3% ao FT 7a.

A predominância do fagotipo 4 observado nas cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras relacionadas a aves e seu ambiente criatório está em concordância com o observado em um estudo da diversidade de cepas de *Salmonella* Enteritidis em granjas de produção avícola da Inglaterra (Liebana *et al.*, 2001).

Porém tais dados estão em desacordo com os obtidos por Khakhria *et al.* (1991) e Hickman-Brenner *et al.* (1991), no Canadá e Estados Unidos respectivamente que observaram que entre as *Salmonella* Enteritidis isoladas de aves, o FT 8 foi o predominante.

No Brasil, em estudo realizado por Nunes *et al.* (2003), dentre as *Salmonella* Enteritidis isoladas de aves e seu ambiente criatório o FT 4 foi o predominante. Porém,

enquanto Nunes *et al.*, (2003), obtiveram o FT 7, como sendo o segundo mais isolado, no presente estudo foi o FT 4a.

Nos isolados de carcaças resfriadas de frango 94,1% são do FT 4 e 5,9% (1/17) do fagotipo 4a.

A baixa diversidade fagotípica entre as *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frango da região nordeste do Brasil chama a atenção, porém é corroborada por Santos *et al.*, (2003), que entre *Salmonella* Enteritidis isoladas de carcaças de frango na região Sul do Brasil, também obtiveram somente isolados de dois fagotipos, FT 4 (93,3%) e FT 4a (6,7%).

Nunes *et al.* (2003), por sua vez, em isolados de carne de frango obtiveram uma diversidade um pouco maior, FT 4 (91,9%), FT 6 (2,7%), FT 7 (2,7%) e FT 35 (2,7%).

Os resultados obtidos demonstraram que o FT 4 foi o predominante, que entre as cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de aves e de seu ambiente criatório existe uma maior diversidade de fagotipos e que entre as cepas isoladas de carcaças de frango esta diversidade é baixa.

REFERÊNCIAS

1. Alonso, R., Echeita, P., Espinosa, P., Usera, M.A. (1987). Attempts to Establish Phage Typing as an Epidemiology Marker for *Salmonella* enteritidis. *An. De L'Institut Pasteur/Microbiol.*, v. 138, p. 579-585.
2. Anderson, E.S., Williams, R.E.O. (1956). Bacterophage Typing of Enteric Pathogens ad Staphylococci and its Use in Epidemiology. *J. Clin. Pathol.*, v. 9, p. 94-115.
3. Fantasia, M., Filetici, E. (1994). *Salmonella* Enteritidis in Italy. *Int. J. Food Microbiol.*, v. 21, p. 7-13.
4. Fernandes, S., Ghilardi, A.C.R., Tavechio, A.T., Machado, A.M.O., Pignatari, A.C.C. (2003). Phenotypic and Molecular Characterization of *Salmonella* Enteritidis Strains Isolated in São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 45, p. 59-63.
5. Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., Ghilardi, A.C.R., Dias, A.M.G., Almeida, I.A.Z.C., Melo, L.C.V. (2006). *Salmonella* Serovars Isolated from Humans in São Paulo State, Brasil, 1996-2003. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 48, p. 179-184.
6. Gershman , M. (1976). Phage Typing System for *Salmonella* enteritidis. *Appl. Environ. Microbiol.*, V. 32, p. 190-191.
7. Herikstad, H., Motarjemi, Y., Tauxe, R.V. (2002). *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiol. Infect.*, v. 129, p. 1-8.
8. Hickman-Brenner, F.W., Stubbs, A.D., Farmer III, J.J. (1991). Phage Typing of *Salmonella* enteritidis in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, v. 29, p. 2817-1823.
9. Kanashiro, A.M., Stoppa, G.F.Z., Cardoso, A.L.S.P., Tessari, E.N.C., Castro, A.G.M. (2005). Serovars of *Salmonella* spp Isolated from Broiler Chickens and Commercial Breeders in Diverse Regions in Brazil July 1997 to December 2004. *Braz. J. Poult. Sci.*, v. 7, p. 195-198.
10. Khakhria, D., Duck, D., Lior, H. (1991). Distribution of *Salmonella enteritidis* phage types in Canada. *Epidemiol. Infect.*, v. 106, p. 25-32.
11. Liebana, E., Migura, L.G., Breslin, M.F., Davies, R.H., Woodward, M.J. (2001). Diversity of Strains of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis from English Poultry Farms Assessed by Multiple Genetic Fingerprinting. *J. Clin. Microbiol.*, v. 39, p. 154-161.
12. Nunes, I.A., Helmuth, R., Schroeter, A., Mead, G.C., Santos, M.A.A., Solari, C.A., Silva, O.R., Ferreira, A.J.P. (2003). Phage Typing of *Salmonella* Enteritidis from Different Soucers in Brazil. *J. Food Protec.*, v. 66, p. 324-327.
13. Santos. S.M.S., Berchieri Jr., A., Fernandes, S.A., Tavechio, A.T., Amaral, L.A. (2000). *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesq. Vet. Bras.*, 20(1), 39-42.
14. Santos, L.R., Nascimento, V.P., Oliveira, S.D., Rodrigues, D.P., Resis, E.M.F., Seki, L.M., Ribeiro, A.R., Fernandes, S.A. (2003). Phage Types of *Salmonella* Enteritidis Isolated from Clinical and Food Samples, and from Broiler Carcasses in Southern Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São. Paulo*, v. 45, p. 1-4.
15. Schoeter, A., Ward, L.R., Rowe, B., Protz, D., Hartung, M., Helmuth, R. (1994). *Salmonella enteritidis* phage types in Germany. *Eur. J. Epidemiol.*, v. 10, p. 645-648.
16. Tavechio, A.T., Ghilardi, A.C.R., Peresi, J.T.M., Fuzihara, T.O., Yonamine,

- E.K, Jakabi, M., Fernandez, S.A. (2002). *Salmonella* serotypes Isolated from Nonhuman Sources in São Paulo Brazil, from 1996 through 2000. *J. Food Protec.*, 65(6), 1041-1044.
17. Van Duijkeren E., Wannet, W.J.B., Houwers, D.J., Van Pelt, W. (2002). Serotype and Phage Type Distribution of *Salmonella* Strains Isolated from Humans, Cattle, Pigs, and Chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. *J. Clin. Microbiol.*, v.40, p. 3980-3985.
18. Ward, L.R., de Sa, J.D.H., Rowe, B. (1987). A phage typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidem. Infect.*, 99, 291-294.

Tabela 1. Distribuição dos fagotipos de *S. Enteritidis* de acordo com a origem e período de isolamento

Origem	Ano	Fagotipo					Total	
		1	4	4a	6	6a		7a
Aves e ambiente de aves (swab de arrasto)	1999	5	13	13	-	1	-	32
	2000	4	21	1	1	-	1	28
	2001	5	10	3	-	-	-	18
Carcças resfriadas de frango	2004	-	5	-	-	-	-	5
	2005	-	11	1	-	-	-	12
Totais		14	60	18	1	1	1	95
		14,7%)	(63,1%)	(18,9%)	(1,1%)	(1,1%)	(1,1%)	(100%)

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo desta tese foi fornecer dados a respeito da resistência a agentes antimicrobianos, bem como da detecção de mutação no gene *gyrA* da região determinante de resistência a quinolonas em amostras resistentes ao ácido nalidíxico, fagotipagem e ribotipagem de cepas de *Salmonella* Enteritidis (SE).

Os dados de resistência a agentes antimicrobianos das cepas de SE isoladas de amostras clínicas e do ambiente criatório de aves (n: 79), de cortes de frango (n: 21), na região Sul e de carcaças de frango (n: 17), na região Nordeste, indicaram que 85,7% (100/117) das cepas de SE apresentaram resistência a um ou mais agentes antimicrobianos, sendo que o maior percentual está entre as cepas isoladas de carcaças resfriadas de frango, 100% (17/17), seguidas pelas isoladas de cortes de frango, 85,7% (18/21) e das de amostras clínicas e de ambiente criatório de aves, 82,3% (65/79).

Cepas resistentes em diferentes níveis foram encontradas para ampicilina (0,8%), canamicina (1,7%), ciprofloxacina (1,7%), enrofloxacina (8,5%), gentamicina (15,4%), estreptomicina (16,2%), ácido nalidíxico (35,9%), nitrofurantoína (38,4%) e tetraciclina (60,7%). Nenhuma das 117 cepas de *Salmonella* Enteritidis foi resistente ao cloranfenicol, norfloxacina e polimicina B.

Dentre as 100 cepas de *Salmonella* Enteritidis que apresentaram resistência, 66% (66), formaram resistentes a dois ou mais agentes antimicrobianos. Trinta e quatro cepas (34%), foram resistente somente a uma agente antimicrobiano, 18 a tetraciclina, 11 a nitrofurantoína, três ao ácido nalidíxico, uma a estreptomicina e uma a gentamicina.

Quando levamos em consideração de onde foram isoladas as *Salmonella* Enteritidis, notamos que a tetraciclina foi o agente antimicrobiano que apresentou maior índice de resistência, 67,1% e 80,9%, entre as cepas de amostras clínicas e ambiente criatório de aves e de corte de frango respectivamente, ambos isolados na Região Sul, já entre os isolados de carcaças resfriadas de frango a nitrofurantoína, com 94,1% de cepas resistentes, foi a que teve maior incidência, tendo sido as mesmas, isoladas na Região Nordeste.

As cepas isoladas de carne de frango (cortes e carcaças resfriadas) foram sensíveis a ampicilina, cloranfenicol, norfloxacina, gentamicina, ciprofloxacina e polimixina B, enquanto as isoladas de aves e do seu ambiente criatório, foram sensíveis

somente ao cloranfenicol, norfloxacin e polimixina B.

Os dados de resistência a agentes antimicrobianos indicaram que levantamentos contínuos são necessários na indústria avícola e que existe a necessidade de um uso responsável dos agentes antimicrobianos, baseado na compreensão da ecologia da resistência, da transmissão da bactéria resistente e de genes de resistência, da relação entre o uso do antibiótico e aumento da resistência e de um conhecimento de intervenções efetivas.

Com relação a detecção de mutação no gene *gyrA* da região determinante de resistência a quinolonas em amostras resistentes ao ácido nalidíxico demonstrou-se que assim como em outros trabalhos, amostras de SE resistentes ao ácido nalidíxico, isoladas no Brasil, também apresentam mutação no gene *gyrA*, da região determinante de resistência a quinolonas. A mutação predominante foi a que ocorreu no condon Asp-87. 66,6% das cepas que apresentaram mutação de Ser para Phe no codon 83, apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e a enrofloxacin.

A fagotipagem de 116 das 117 cepas de SE utilizadas no presente estudo apresentou que 68,9% (80/116) pertencem ao fagotipo (FT) 4, 15,5% (18/116) ao FT 4a, 12,2% (14/116) ao FT 1, 0,9% (1/116) ao FT6, 0,9% ao FT 6a, 0,9% ao FT 7 e 0,9% ao PT 7a.

Quando levamos em consideração a origem dos isolados, observamos que nas SE isoladas de amostras clínicas e ambientais (*swab* de arrasto) de aves nos anos de 1999, 2000 e 2001, 56,4% pertencem ao FT 4, 21,8% ao 4a, 17,9% ao 1, 1,3% ao FT 6, 1,3% ao FT 6a e 1,3% ao FT 7a .

Nas amostras isoladas de carne cortes de frango, o FT 4 predomina com 95,2% (20/21) e 4,8% (1/21), pertencem ao FT 7. Nos isolados de carcaças resfriadas de frango 94,1% são do FT 4 e 5,9% (1/17) do FT 4a .

A predominância do FT 4 observado nas cepas de SE isoladas de amostras relacionadas a aves e seu ambiente criatório, bem como de cortes e carcaças de frango está em concordância com o observado em um estudos da diversidade de cepas de SE na maioria dos países.

As cepas de SE isoladas de carcaças e cortes de frango apresentam baixa diversidade fagotípica quando comparadas as isoladas de aves e de seu ambiente criatório.

As 28 cepas de SE isoladas de carcaças resfriadas de frango na região Sudeste, no ano de 2004, que foram avaliadas pela técnica de Ribotipagem automatizada apresentaram um baixo grau de diversidade gênica, sugerindo que 82,1% das carcaças de frango avaliadas foram contaminadas pelo mesmo clone de SE.