



## Detecção de *Salmonella* sp. e caracterização de isolados de *Salmonella* Enteritidis pela presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e rep-PCR Fingerprinting\*

SÍLVIA DIAS DE OLIVEIRA

Adriano Brandelli (Orientador - UFRGS)  
Cláudio Wageck Canal (Co-orientador - UFRGS)

Banca: Benito Guimarães de Brito (UEL), Gertrudes Corção (UFRGS), Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso (UFRGS)

A salmonelose é uma das zoonoses mais importantes em todo o mundo, e desde a década de 80, ocorreu um notável aumento no relato de isolamentos de *Salmonella* Enteritidis. Desta forma, torna-se cada vez mais relevante e necessária a implementação de técnicas que visem à sua detecção e identificação mais acuradas. Numa primeira etapa, este trabalho teve como objetivo avaliar a combinação da PCR com caldos de enriquecimento seletivo (PCR-RV) e não seletivo (PCR-NS) para a detecção e identificação de *Salmonella* sp. em amostras de origem avícola. A PCR-RV detectou significativamente mais amostras positivas para *Salmonella* do que a PCR-NS. A técnica microbiológica convencional também foi comparada às outras duas, mostrando ser mais sensível do que a PCR-NS, porém menos sensível do que a PCR-RV. Em relação à identificação dos sorovares Typhimurium, Enteritidis, Gallinarum e Pullorum, a PCR-RV apresentou resultados similares à técnica convencional e ambas foram mais sensíveis do que a PCR-NS. Na segunda etapa, foram caracterizadas 111 culturas de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, alimentos, carcaças de frango, aves e suínos através de rep-PCR, presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e da combinação destes com a fagotipagem. No teste de resistência a antimicrobianos, foi observada uma alta prevalência de resistência aos antimicrobianos testados. Os isolados de produtos de origem avícola apresentaram resistência significativamente maior à gentamicina, estreptomicina e ao ácido nalidíxico do que os demais isolados. Os maiores níveis de resistência foram encontrados para sulfonamida e nitrofurantoína. Foram detectados 27 diferentes perfis de resistência antimicrobiana nos isolados analisados. Quanto à detecção de genes de virulência por PCR, o *invA* foi detectado em todos os isolados, enquanto os genes *spvR* e *spvC* foram detectados em 91,2% e 90,2% dos isolados, respectivamente. Na rep-PCR, em cada uma das três diferentes técnicas (REP, ERIC e BOX-PCR) foram gerados três perfis. Os isolados não foram discriminados adequadamente, uma vez que a maioria deles foi agrupada em um mesmo perfil. Esta técnica apresentou poder discriminatório menor do que a fagotipagem. Uma alternativa para proporcionar a discriminação destes isolados foi a associação com outros métodos de tipificação. Quando foram associados os resultados da rep-PCR, fagotipagem, presença de genes de virulência e resistência a drogas antimicrobianas, foram observados 48 diferentes tipos entre os 111 isolados. Concluiu-se que a rep-PCR, como um único método, não foi adequada para a tipificação destes isolados de *S. Enteritidis*.

**Descritores:** *Salmonella*, PCR, detecção, rep-PCR, fagotipagem, resistência antimicrobiana, genes de virulência.



## Detection of *Salmonella* sp. and characterization of *Salmonella* Enteritidis by presence of virulence genes, antimicrobial resistance and rep-PCR Fingerprinting\*\*

SÍLVIA DIAS DE OLIVEIRA

Adriano Brandelli (Adviser - UFRGS)  
Cláudio Wageck Canal (Co-Adviser - UFRGS)

Committee: Benito Guimarães de Brito (UEL), Gertrudes Corção (UFRGS), Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso (UFRGS)

Salmonellosis is one of the zoonotic diseases most important in wide world and since the 1980's there has been a dramatic increase in the number of reported isolations of *S. Enteritidis*. Therefore, the implementation of accurate methods for detection and identification of *Salmonella* sp. became relevant and required. In a first step, the purpose of this study was to compare the PCR combined with non-selective (PCR-NS) and selective (PCR-RV) enrichment broth for detection and identification of *Salmonella* sp. in poultry samples. PCR-RV detected significantly more positive samples of *Salmonella* sp. than PCR-NS. The standard microbiological technique also has been compared to PCR-RV and PCR-NS, showing be more sensitive than PCR-NS, but less sensitive than PCR-RV. Regarding the identification of Typhimurium, Enteritidis, Gallinarum e Pullorum serovars, the PCR-RV showed similar results to standard microbiological technique and both were more sensitive than PCR-NS. In a second step, 111 cultures of *S. Enteritidis* isolated from human, food, broiler carcasses, poultry and swine were characterized through rep-PCR, presence of virulence genes, antimicrobial resistance and by the combination of these methods with phage typing. In the antimicrobial resistance test, a high prevalence of resistance was observed. The isolates from poultry showed higher levels of resistance to gentamicin, streptomycin and nalidixic acid than the other isolates. The highest levels of resistance were found for sulphonamides and nitrofurantoin. Twenty-seven resistance patterns were found. Regarding the detection of virulence genes by PCR, *invA* was detected in all isolates, whereas *spvR* and *spvC* genes were detected in 91.2% and 90.2% of isolates, respectively. In the rep-PCR, each of three different methods (REP, ERIC e BOX-PCR) generated three different profiles. The isolates were not adequately discriminated, since the majority was clustered in the same group. This method was displayed a lower discriminatory power than phage typing. An alternative to improve the discrimination of these isolates was the association with other typing methods. When rep-PCR, phage typing, presence of virulence genes and antimicrobial resistance, were associated, 48 different types resulted from the 111 isolates. It is concluded that the rep-PCR alone, was not enough for typing of these *S. Enteritidis* isolates.

**Key words:** *Salmonella*, PCR, detection, rep-PCR, phage typing, antimicrobial resistance, virulence genes.

Presented: 08 March 2004

\*\*Doctoral Dissertation # 32 (Field: Bacteriology). 141p. Graduate Program in Veterinary Sciences, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/Brazil. CORRESPONDENCE: S.D. Oliveira [silviadias@puers.br].