

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE *Salmonella enterica*
ISOLADOS EM PESCADO**

Julierme José de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Cíntia S. Minafra e Rezende

GOIÂNIA

2019

JULIERME JOSÉ DE OLIVEIRA

**PERFIS DE VIRULÊNCIA E RESISTÊNCIA DE *Salmonella enterica*
ISOLADOS EM PESCADO**

Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Federal de Goiás

Área de Concentração:

Sanidade animal, Higiene e Tecnologia de
Alimentos

Linha de Pesquisa:

Controle de qualidade em alimentos

Orientadora:

Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende –
EVZ/UFG

Comitê de Orientação:

Profa. Dra. Iolanda Aparecida Nunes –
EVZ/UFG

Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade –
EVZ/UFG

GOIÂNIA

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e à Nossa Senhora do Perpétuo Socorro por mais esta conquista, e por sempre me acompanharem e intercederem por mim.

Aos meus pais Josué Rufino de Oliveira e Maria Aparecida Cardoso de Oliveira pelo amor, carinho e dedicação dados a mim por todos esses anos e em especial por serem minha inspiração, exemplo de vida e conduta a serem seguidos.

A minha irmã Katiusce Cardoso de Oliveira pela cumplicidade e incentivo na realização deste trabalho e de outros que estão por vir.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende, pela amizade, pelos conselhos, pelo apoio, confiança, pelos ensinamentos e exemplo.

Aos professores da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás pelo apoio e ensinamentos compartilhados desde a graduação. Em especial, agradeço à Profa. Dra. Iolanda Aparecida Nunes e a Profa. Dra. Maria Auxiliadora Andrade, pelos ensinamentos e ajuda constantes no decorrer do projeto.

Aos colaboradores do Centro de Pesquisa em Alimentos que de forma valiosa contribuíram para a execução deste trabalho. Em especial, meus agradecimentos a Magno Cândido da Silva Júnior e Eivaldo Lourenço de Souza por toda prestatividade e conhecimentos compartilhados.

À toda equipe do laboratório multiusuário, que carinhosamente apelidamos de “cafofo”, Fernanda Antunha de Freitas, Janaína Costa Feistel, Marília Cristina Sola, Cristyene Gonçalves e Úrsula Rauecker, meus sinceros agradecimentos. Todas vocês contribuíram de forma importante para a realização deste trabalho e para meu engradecimento pessoal.

Agradeço também, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela oportunidade de desenvolvimento e realização deste estudo.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 <i>Salmonella</i> sp.....	3
2.2 Genes de virulência.....	5
2.3 Resistência a antimicrobianos.....	7
REFERÊNCIAS.....	10
CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO CONVENCIONAL, SOROTIPIFICAÇÃO, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E <i>Integron</i> DE CLASSE 1 e <i>gyrA</i> EM <i>Salmonella enterica</i> ISOLADOS EM PESCADO.....	14
INTRODUÇÃO.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	20
REFERÊNCIAS.....	35
CAPÍTULO 3 - DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA EM <i>Salmonella enterica</i> ISOLADOS EM PESCADO.....	40
INTRODUÇÃO.....	40
MATERIAL E MÉTODOS.....	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
REFERÊNCIAS.....	52
CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Suscetibilidade a antimicrobianos de <i>Salmonella enterica</i> isolados em produtos de pescado.....	24
TABELA 2 - Frequência da região variável do <i>Integron</i> de Classe 1 em <i>Salmonella enterica</i> isolados em pescado, segundo sorovares.....	29
TABELA 3 - Distribuição da presença do <i>Integron</i> de Classe 1 em Tipos de pescado e seus produtos.....	31
TABELA 4 - Frequência de detecção do gene <i>gyrA</i> em <i>Salmonella enterica</i> isolados em pescado, segundo sorovares.....	32
TABELA 5 - Frequência de detecção do gene <i>gyrA</i> comparado à resistência a fluorquinolonas.....	33

CAPÍTULO 3

TABELA 1 - Distribuição de genes de <i>Salmonella enterica</i> em perfis de virulência e sua frequência de acordo com os sorovares.....	47
TABELA 2 - Frequência de genes de virulência em <i>Salmonella enterica</i> de acordo com os sorovares.....	48

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 2

QUADRO 1-	Sequência de iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real.....	19
QUADRO 2-	Tipo de amostra, origem e sorovares de <i>Salmonella enterica</i> isolados de pescado.....	20
QUADRO 2-	Tipo de amostra, origem e sorovares de <i>Salmonella enterica</i> isolados de pescado (continuação).....	21
QUADRO 3-	Perfil de resistência a antimicrobianos de <i>Salmonella enterica</i> isolados de pescado.....	26
QUADRO 4-	Sorovares de <i>Salmonella enterica</i> oriundos de pescado com perfil de sensibilidade total às bases testadas.....	27

CAPÍTULO 3

QUADRO 1-	Sequência de iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real.....	44
-----------	-----------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

μL	- Microlitos
AMP	- Ampicilina
A_w	- Activity of Water
BHI	- Brain Heart Infusion
BLAST	- Basic local alignment search tool
CIP	- Ciprofloxacino
CDC	- Center Disease Control
CRO	- Ceftriaxona
CTX	- Cefotaxima
CLSI	- Clinical and laboratory standards institute
CPA	- Centro de Pesquisa em Alimentos
DNA	- cido desoxirribonucleico
DVA's	- Doenças veiculadas por alimentos
EVZ	- Escola de Veterinária e Zootecnia
H_2S	- cido sulfídrico
LPF	- Fímbria polar longa
LPS	- Lipopolissacarídeo
mL	- Mililitos
mm	- Milímetros
Na^+	- íon sódio
NAL	- cido nalidixico
NCBI	- National center for biotechnology Information
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
pH	- Potencial Hidrogeniônico
rpm	- Rotação por minuto
RpoS	- Fator Sigma, RNA polimerase
SUT	- Sulfametoxazol-Trimetropim
SPI	- Ilhas de patogenicidade de salmonella
SPV	- Salmonella plasmid virulence
SSTIII	- Sistema de secreção do tipo III
Tn	- Transposon
TSI	- gar tríplice auar ferro
TTSS	- Sistemas de secreções tipo
UFG	- Universidade Federal de Goiás
XLT4	- Xilose lisina tergitol 4

RESUMO

Salmonella enterica, é reconhecidamente o agente etiológico bacteriano, mais associado a doenças de veiculação alimentar (DVA's) e apesar de grande parte dos alimentos veiculadores serem de origem avícola, outras matrizes alimentares como pescados, não podem ser descartados como alimentos veiculadores em potencial desse patógeno. Pelo exposto, objetivou-se com este trabalho verificar o perfil de suscetibilidade de *Salmonella enterica* para ácido nalidixico (30µg), ampicilina (10mg), cefotaxima (30µg), ceftriaxona(30µg), ciprofloxacina(5µg) e sulfametazol trimetropim (5µg). Determinar a presença de perfis de multirresistência. Detectar a presença do *Integron* de classe 1 e *gyrA* e analisar a associação desses, com o perfil de resistência antimicrobiana. Detectar a presença dos genes de virulência *invA*, *hilA*, *hilD*, *lpfA* e *spvR* nas cepas de *Salmonella enterica* isolados de pescado. A maior frequência de resistência foi observada para ácido nalidíxico, 51,2% (21/41), seguido por cefotaxima e ampicilina, com 36,5% cada (15/41), ceftriaxona 29,2% (12/42), sulfametazol trimetropim 21,9% (9/42), e ciprofloxacino 14,6% (6/42). Foram identificados 17 perfis de resistência à antimicrobianos e 51,2% (21/41) dos isolados apresentaram multirresistência. O *Integron* de Classe 1 foi detectado em 68,3% (28/41) dos isolados. Apesar de número considerável de detecções, a presença do *Integron* de classe 1 demonstrou associação apenas para a resistência à ceftriaxona. O gene *gyrA*, em 78% dos isolados (32/41). O gene de virulência *invA* foi identificado em 100% (41/41), *spvR* em 70,7% (29/41), *hilD* em 24,4% (10/41) e *hilA* em 21,9% (9/41) e *lpfA* em 19,5% (8/41) dos sorovares identificados de *Salmonella enterica*. Foram identificados nove perfis de virulência (A, B, C, D, E, F, G, H e I). Ao todo, 50 % dos isolados se agruparam no perfil H, que possui como característica a ocorrência de dois genes de virulência simultaneamente. O conhecimento dos perfis de virulência e resistência dos isolados permite afirmar que os sorovares identificados oriundos de pescado são potencialmente virulentos e demandam vigilância por parte dos órgão de vigilância e saúde pública.

Palavras-chave: *invA*, Antimicrobiano, Sorovar, Multirresistência, Aquicultura.

ABSTRACT

Salmonella enterica is known to be the bacterial etiological agent most associated with foodborne diseases (AVDs) and although most of the feeds are of poultry origin, other food matrices such as fish can not be discarded as potential food carriers of this pathogen. The aim of this study was to verify the susceptibility of *Salmonella enterica* to nalidixic acid (30µg), ampicillin (10mg), cefotaxime (30µg), ceftriaxone (30µg), ciprofloxacin (5µg) and sulfamethazole trimetropin (5µg). Determine the presence of multiresistance profiles. To detect the presence of *Integron* of class 1 and *gyrA* and to analyze the association of these, with the antimicrobial resistance profile. Detect the presence of virulence genes *invA*, *hilA*, *hilD*, *lpfA* and *spvR* in *Salmonella enterica* strains isolated from fish. The highest frequency of resistance was observed for nalidixic acid, 51.2% (21/41), followed by cefotaxime and ampicillin, with 36.5% each (15/41), ceftriaxone 29.2% (12/42), sulfamethazol trimetropyr 21.9% (9/42), and ciprofloxacin 14.6% (6/42). Seventeen antimicrobial resistance profiles were identified and 51.2% (21/41) of the isolates presented multiresistance. *Integron* Class 1 was detected in 68.3% (28/41) of the isolates. Despite the considerable number of detections, the presence of *Integron* class 1 demonstrated association only for resistance to ceftriaxone. The *gyrA* gene, in 78% of the isolates (32/41). The *invA* virulence gene was identified in 100% (41/41), *spvR* in 70.7% (29/41), *hilD* in 24.4% (10/41) and *hilA* in 21.9% (9/41) and *lpfA* in 19.5% (8/41) of identified serovars of *Salmonella enterica*. Nine virulence profiles (A, B, C, D, E, F, G, H and I) were identified. In all, 50% of the isolates were grouped in the H profile, which has as a characteristic the occurrence of two virulence genes simultaneously. The knowledge of the virulence and resistance profiles of the isolates makes it possible to state that the identified serovars originated from fish are potentially virulent and require vigilance by the surveillance and public health agencies.

Keywords: *invA*, Antimicrobial, Sorovar, Multiresistance, Aquaculture.

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

Salmonella enterica é o microrganismo mais associado às doenças de veiculação alimentar (DVA'S) em diversos países, sendo a bactéria mais detectada a essas enfermidades nos Estados Unidos e Europa^{1,2}. No Brasil, somente no ano de 2017, foram registrados 441 surtos de DVA's, que afetaram diretamente 6.559 pessoas, e dentre esses surtos, cerca de 32%, foram causados por *Salmonella* sp³.

Ainda tratando do Brasil, dos surtos ocorridos no ano de 2017, em mais de 40% dos surtos, o alimento veiculador do patógeno não foi identificado e em 0,84% estiveram associados a pescado³. Os produtos avícolas são considerados os principais alimentos veiculadores de *Salmonella enterica*, porem outras matrizes alimentares, como o pescado, não podem ser descartadas ou negligenciadas, como veiculadores desse microrganismo patogênico, já que naturalmente possuem características físico-químicas que atendem às necessidades exigidas pelo microrganismos para sua multiplicação e viabilidade⁴.

No ano de 2017, no Brasil foram produzidos, mais de 485.000 t de pescado, quando considerados demais produtos da aquicultura, como camarões, ostras e vieiras esse valor ultrapassa a marca de 547.000 t produzidas, o que gerou uma receita ao país de 4 bilhões de reais⁵. Dentre os estados com maior produção destacam-se Paraná, São Paulo e Rondônia, respectivamente. O estado de Goiás ocupa a décima colocação no ranking nacional de produção de produtos de aquicultura⁵.

Salmonella sp., não é um microrganismo naturalmente encontrado em matrizes alimentares como o pescado, baseado nisso é atribuído como fontes de contaminação a qualidade da água de represas de criação de peixes, criação compartilhada de pescado e outras espécies, como por exemplo os suínos, na mesma propriedade rural, circulação de aves silvestres e localização das represas, que se mal localizadas podem receber grande quantidade de água de superfícies e conseqüentemente contaminantes⁶.

A gastroenterite é o sinal mais comum das salmoneloses, e na maioria dos casos o curso da doença é auto-limitante. Porém, em alguns casos, principalmente aqueles que envolvam pacientes do grupo de risco como, gestantes, idosos, crianças e imunocomprometidos, a infecção pode tornar-se sistêmica podendo levar a óbito⁷. No Brasil apenas quando considerado o ano de 2017, oito óbitos foram confirmados em razão de doenças veiculadas por alimentos³.

A gravidade dos sinais clínicos depende de diversos fatores, dentre eles, os fatores de virulência que o patógeno carrega consigo por meio dos genes de virulência, que podem estar associados tanto no cromossomo bacteriano como em elementos genéticos móveis que podem ser compartilhados entre as bactérias, como os plasmídeos⁸.

Os antimicrobianos têm sido fundamentais no controle de infecções por *Salmonella enterica*. No entanto, com o passar dos anos, o uso indiscriminado destas drogas tem promovido a seleção de bactérias resistentes, reduzindo a eficácia dos mesmos no tratamento de salmonelose e aumentando a gravidade dos casos⁹.

Pelo apresentado anteriormente, fica evidenciado a importância e necessidade de estudos que avaliem os perfis de resistência e virulência de *Salmonella enterica* oriundos de diferentes matrizes alimentares, gerando assim dados de grande relevância que revelem o atual cenário da circulação do microrganismo e estratégias eficazes de tratamento e controle do patógeno.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho verificar o perfil de suscetibilidade de *Salmonella enterica*, isolados de pescado para seis bases de antibióticos, utilizados tanto na medicina humana quanto veterinária e determinar a existência de isolados multirresistentes. Também propôs-se, a detecção do *Integron* de classe 1 e analisar a associação entre a presença deste e a resistência antimicrobiana e detecção do gene de resistência *gyrA*. Ainda objetivou-se avaliar a presença de genes de virulência *invA*, *hilA*, *hilD*, gene codificador de fímbria polar longa (*lpfA*) e o plasmidial *spvR* e identificar os perfis de virulência dos sorovares de *Salmonella enterica* isolados em pescados.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* sp.

O gênero *Salmonella*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é constituído por duas espécies, a primeira *Salmonella enterica*, que é subdividida em seis subespécies *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* e a segunda *Salmonella bongori*. São bastonetes Gram-negativos, não esporulados, a maioria são móveis por possuírem flagelos e são anaeróbios facultativos. Os sorovares Pullorum e Gallinarum são exemplos de *Salmonella* que não possuem motilidade ¹⁰.

Quanto a temperatura ótima de multiplicação, entre 35°C a 43°C, essas bactérias podem ser classificadas como mesófilas, porém elas possuem capacidade de multiplicação em ampla faixa de temperatura, entre 5,2°C e 46,2°C. O índice mínimo para multiplicação, quanto a atividade de água (a_w) é de 0,93. Quanto ao pH esse microrganismo não possui grandes especificações, sendo seu crescimento notado em faixas entre 3,8 e 9,4, porém índices ótimos estão entre o pH 7,0 a 7,6 ¹¹. *Salmonella* sp. utiliza como fonte de carbono o citrato, são oxidase negativos, catalase positivos, indol negativos, possuem capacidade de produção de H₂S, e não hidrolisam uréia ¹².

A sorotipificação de *Salmonella* sp. tem por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H) e capsulares (Vi). A maioria dos sorovares já determinados, estão alocados na espécie *Enterica* subsp *entérica* ¹³.

Os antígenos somáticos (O) caracterizam os sorogrupos de *Salmonella* e são indentificados por numeração arábica. Antígenos flagelares (H), possuem antígenos de fase 1, que são designados por letras minúsculas do alfabeto e antígenos de fase 2 marcados por numeração arábica. Quantitativamente, antígenos flagelares de fase 1 são superiores à quantidade de letras do alfabeto, sendo assim a letra Z é utilizada associada a números, como Z₁, Z₂, Z₃, etc ¹⁰.

Em alguns casos, sorovares de *Salmonella enterica* são espécie específicos altamente adaptada aos animais, como *Salmonella enterica* sorovar Gallinarum e *Salmonella enterica* sorovar Pullorum, que acometem exclusivamente as aves, enquanto outros sorovares atingem indiferentemente o ser humano e os animais, sendo designados como sorovares zoonóticos, como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, geram quadros de gastroenterites e reportadas como agente etiológico em doenças veiculadas por alimentos. Assim como existem sorovares altamente adaptados a espécies específicas de animais,

existem sorovares altamente adaptados ao homem, como *Salmonella enterica* sorovar Typhi e *Salmonella enterica* sorovar Paratyphi. ¹⁴.

A via de infecção por *Salmonella enterica* ocorre majoritariamente por via fecal-oral, possuindo como principais veiculadores água e/ou alimentos contaminados¹⁵. Uma vez ingerida, a bactéria que possui capacidade de sobrevivência frente a exposição ao suco gástrico, alcança o intestino delgado e adere-se às células, sendo esse seu local de predileção. A notória capacidade de adesão de *Salmonella* às células intestinais, é atribuída principalmente a um importante fator de virulência característico desses patógenos, que são as fímbrias, que reconhecem e se fixam à célula hospedeira, por ação de adesinas. ⁸. Também é atribuído, as fímbrias, persistência ambiental e formação de biofilme, que garantem a viabilidade por períodos relativamente prolongados, do microrganismos em ambientes externos, como superfícies de manipulação de alimentos¹⁶.

Uma vez fixadas, às células do intestino delgado, mais especificamente aos enterócitos e células M, *Salmonella* sp. por intermédio de um sistema de secreção do tipo III (T3SS), codificado pela ilha de patogenicidade de *Salmonella* 1 (SPI-1), secreta para o interior da célula hospedeira proteínas efetoras, que como principal mecanismo de ação, alteram vias de sinalização celulares que resultam em um rearranjo do citoesqueleto, facilitando a entrada do microrganismo, para o interior da célula por endocitose. Intracelularmente, *Salmonella enterica* inicia seus processos de multiplicação no citoplasma da célula invadida ¹⁷. Também atuam diretamente no processo de invasão intracelular a presença de genes *inv*, localizados em regiões cromossômicas altamente conservadas em *Salmonella enterica* ¹⁸.

Concomitante ao rearranjo do citoesqueleto, proteínas efetoras oriundas de *Salmonella enterica* induzem ao aumento da expressão de fatores quimioestáticos, que aumentam a migração de neutrófilos e macrófagos para a região onde ocorre a invasão celular. Uma característica natural desses tipos celulares é a capacidade fagocítica, sendo assim *Salmonella enterica* serão fagocitados e conseqüentemente ocorre a liberação de mediadores inflamatórios. O estímulo inflamatório presente, aliado a intensa migração celular que provoca alterações nos espaços intersticiais das células epiteliais do intestino delgado e a diminuição da absorção do Na⁺ e aumentando secreção do Cl⁻, favorecem a secreção excessiva de fluidos no lúmen intestinal, o que resulta na sintomatologia clássica de quadro diarreico ¹⁷.

A manifestação de sintomatologia e quadro infeccioso causado por *Salmonella enterica*, vai depender do grau de exposição ao agente, ou seja, somente a presença do

microrganismo, não é fator determinante e sim a dose infectante que possui índices variáveis de acordo com o sorovar em questão e fatores relacionados ao hospedeiro, como idade, raça, status imune e nutricional¹⁹.

Na maioria dos casos a gastroenterite causada por *Salmonella enterica* é um processo autolimitante, onde sua sintomatologia é notada de 12 a 36 horas após o contato com o agente infeccioso, e caracteriza-se de maneira geral por hipertermia, cefaléia, diarreia aguda, náuseas e vômito¹¹. Como mencionado anteriormente, dependendo da virulência do sorovar envolvido, o quadro infeccioso pode se estabelecer sistemicamente, principalmente por sorovares que desenvolveram mecanismos de evasão à ação fagolisossomal o que permite sua distribuição por outros órgãos o que pode resultar em um quadro septicêmico de maior agravo que pode resultar em óbito²⁰.

2.2 Genes de virulência

Para que *Salmonella enterica*, consiga se multiplicar e se disseminar pelo organismo do hospedeiro, a capacidade de fixação à célula e ao tecido, é de suma importância para continuidade aos processos infecciosos. Sabendo disso, as fímbrias são as principais estruturas envolvidas no processo de aderência à superfície celular²¹.

Cinco *operons* codificam a formação de fímbrias, *fim* (fímbria tipo I), *agf* (fímbria agregativa), *lpf* (fímbria polar longa), *sef* (fímbria *Salmonella* Enteritidis) e *pef* (fímbria codificada por plasmídeo), onde o *operon lpf*, influencia diretamente na capacidade do microrganismo em se aderir às células M, presentes na placa de *Peyer* do íleo²².

Tendo em vista os mecanismos de patogenicidade de *Salmonella enterica* é de fundamental importância a capacidade de invasividade da célula hospedeira para sua multiplicação e os genes responsáveis por essa característica, estão alocados na *SPI-1*. Os genes distribuídos nessa região atuam diretamente na capacidade de produção de proteínas efetoras com ação intracelular e codificação de elementos do sistema de secreção do Tipo III (T3SS)^{23,24}.

A possibilidade de expressão gênica que resulte na formação de SSTIII é de suma importância para as bactérias, por ação desse fator de virulência é possibilitado ao microrganismos o transporte de proteínas efetoras no sentido da célula hospedeira, que influenciam diretamente nos mecanismos fisiológicos celulares, permitindo a entrada de *Salmonella* sp. para o interior da célula, estabelecendo mecanismos de evasão frente ao sistema imune, que possibilitam ao patógeno sobrevivência e multiplicação intracelular²⁵.

Na *SPI-1* encontram-se os genes *inv* (*inv* ABCDEFG) que desempenham papel direto na capacidade de invasão de *Salmonella* sp. na célula hospedeira, onde a presença do gene *invA* é um pré requisito para a expressão dos genes *invBCD*, e aqueles que não possuem sua capacidade de expressão, não possuem capacidade de invasividade para enterócitos ou células M^{26,27}. Ainda na *SPI-1* localiza-se o gene *hil*, que garante à *Salmonella* sp. capacidade invasiva aos eritrócitos, por meio da formação de TTSS e codificação de um regulador transcricional da família *Omp/ToxR* que ativamos genes de invasão²⁸.

Além da capacidade de invasão de células eucarióticas, é de fundamental importância o microrganismo possuir um mecanismo que permita sua sobrevivência no interior das células, ambiente esse que apresenta características normalmente fastidiosas para *Salmonella enterica*, como oxigênio em forma reativa, níveis de pH fora dos níveis ótimos de crescimento e multiplicação, ação de enzimas lisossomais, dentre outros⁸. Os genes que conferem a possibilidade de sobrevivência e multiplicação intracelular, estão relacionados à aqueles situados nas ilhas de patogenicidade de *Salmonella-2* (SPI-2)²⁹.

Em *Salmonella enterica* a SPI-2 está dividida em dois segmentos, uma porção menor de 14,5 kb e uma porção maior de 25,3 kb. Na porção menor estão presentes genes responsáveis pela colonização do microrganismo em ambientes anaeróbios e na porção maior os genes que influenciam diretamente no potencial virulento da bactéria³⁰.

Os genes de virulência presentes em SPI-2, atuam no bloqueio da síntese de formas reativas do oxigênio, codificação do SST III e codificação de proteínas efetoras e suas chaperinas, sendo os principais *ssaR*, *sseD* e *ssrB*. Estes genes são ativados em resposta a alterações intracelulares, como mudança de osmolaridade e pH³¹.

Além dos fatores de virulência presente nas ilhas de patogenicidade, que são associadas ao DNA cromossômico, os plasmídeos, também desempenham importante papel na determinação de grau de virulência de *Salmonella enterica*. Os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossomal, circulares, compartilhados entre bactérias, que contêm genes que podem garantir aos microorganismos maior aporte virulento, vantagens seletivas e resistência à antimicrobianos³².

Os sorovares de *Salmonella enterica*, apresentam plasmídeos com diferentes tamanhos e composição genéticas, e mesmo com tamanha variabilidade, em todos possuem uma região bastante conservada denominada *operon spv* (*Salmonella plasmid virulence*), por sua vez constituído de cinco genes, um regulador *spvR* e quatro estruturais *spvABCD*. Os genes da região *spv* quando ativos, atuam diretamente no crescimento e multiplicação intracelular e potencialização do processo infeccioso, aumentando a severidade de enterite¹⁷.

2.3. Resistência a antimicrobianos

Uma característica inerente à *Salmonella enterica* e que pelos relatos de estudos, vêm se mostrando cada vez mais frequente, é a prevalência crescente de circulação de cepas multirresistentes a antimicrobianos, o que é alvo de preocupação para os sistemas de vigilância em saúde. Nos Estados Unidos, estudos realizados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), apontam que dos dez sorovares mais comumente isolados, oito apresentaram perfis de multirresistência³³.

A característica de resistência a antimicrobianos de um microrganismo, pode ser uma característica natural ou ter sido adquirida, onde na maioria surgiu por mutações genéticas espontâneas, seguidas de processo de pressão seletiva ambiental. A utilização, principalmente de maneira indiscriminada, de antibióticos em protocolos terapêuticos, induz a pressão seletiva sobre bactérias, selecionando a viabilidade das cepas com característica de resistência aos fármacos utilizados³⁴.

São múltiplos, os mecanismos pelos quais as bactérias se mostram resistentes à diversas bases antimicrobianas, como inativação de agentes antimicrobianos por meio de ação enzimáticas degradando-os ou os modificando estruturalmente, ativação de mecanismos de bomba de efluxo, alteração de permeabilidade e modificação do sítio alvo de ação do fármaco³⁵.

β -lactâmicos, são amplamente utilizados em tratamentos para *Salmonella enterica*, que desenvolveram uma capacidade de resistência a esse microrganismos principalmente pela capacidade de secreção de β -lactamase que degradam a estrutura química do anel β -lactâmico³⁷.

O Ácido Nalidíxico é um derivado naftiridínico quimicamente denominado ácido 1-etil-1,4-dihidro-7- metil-4-oxo 1,8-naftiridino-3-carboxílico, atua na inibição da síntese de DNA das bactérias e é recomendado no tratamento de infecções intestinais causadas por bactérias Gram-negativas. A resistência a estes agente é atribuída principalmente a mutações nos genes *gyrA* que codificam subunidades da enzima DNA girasse³⁸.

Sulfametoxazol Trimetropim é uma droga associada que impede a formação de ácido fólico na célula bacteriana, dificultando assim a síntese de DNA, divisão e crescimento celular e produção de novas proteínas efetoras.³⁹.

Os genes que geram resistência a antibióticos, podem estar localizados no DNA cromossomal, ou presente em um fragmento de DNA mediador da integração de genes de

resistência, chamado *Integron*. Posteriormente verificou-se que os *Integrans*, podem estar presentes tanto em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, ou localizados no DNA cromossomal⁴⁰.

Integrans são comumente associados à família *Enterobacteriaceae*, sendo conhecidas cinco classes de *Integrans* móveis (1, 2, 3, 4 e 5), sendo que a classe 1 é a predominante entre os membros desta família, tanto na microbiota saprófita como na patogênica⁴¹.

Os *Integrans*, são constituídos de duas regiões conservadas, separadas por uma região variável onde os genes de resistência a antimicrobianos estão localizados de maneira integrada. O segmento conservado 5' contém o gene *intl* que codifica uma integrase, uma região promotora comum (PC) direcionada para o local de integração e um sítio primário de recombinação *attI*. No segmento conservado 3' estão presentes os genes *qacEΔ1* e *suII* que garantem resistência, ao brometo de etídio e a compostos de amônio quaternário⁵¹ e às sulfonamidas^{42,43}.

Os novos genes de resistência estão incorporados à região variável, do *Integron*, na forma de cassetes genéticos. Os genes recém adicionados podem ser imediatamente expressos, conferindo vantagens fenotípicas. Os genes inseridos apresentam em sua extremidade 3' um sítio denominado *attC*, ou como era chamado anteriormente, elemento 59 bases. Esta região funciona como sítios de reconhecimento para a integrase sitio-específica^{40, 42,44}.

Nos *Integrans* de classe 1, podem conter genes que garantem resistência a diversas classes de antimicrobianos, como todos os Beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, trimetoprima, estreptotricina, rifampina e anti-sépticos da família de compostos de amônio quaternário. Além disso, já foi estabelecido relação entre cepas de *Salmonella* multirresistente e a presença deste *Integron*^{45,46}.

Os *Integrans* de classe 1, podem estar presente em elementos móveis, como plasmídeos, podendo dessa maneira, serem transferidos entre bactérias, inclusive de espécies diferentes, o que do ponto de vista de resistência aos antibióticos é um fator preocupante⁴⁶.

2.4. Importância do pescado no Brasil e no mundo

Como preocupação crescente da população em geral, a busca por alimentos saudáveis e rico em nutrientes, tem se tornado fator primordial no que tange padrões de uma vida mais saudável e nesse sentido o pescado é uma matriz alimentar de grande procura, uma vez que possui em sua composição importantes elementos nutritivos, vitaminas A e D, cálcio,

ômega-3 e fósforo, baixa quantidade e considerável qualidade dos lipídios, além da presença de proteínas de elevado valor biológico⁴⁷.

Conseqüentemente, o consumo de pescado vem aumentando gradativamente. De acordo com a FAO⁴⁸, até o ano de 2030, espera-se que o consumo total de pescado aumente em todas as regiões e sub-regiões, com um forte crescimento projetado na América Latina (+33%), África (+37%), Oceania (+28%) e Ásia (+20%).

Na América Latina, estima-se que 3,8 milhões de pessoas dependem diretamente da aquicultura para sua sobrevivência, e que só na amazonia brasileira, as famílias obtenham 30% da renda familiar com a pesca⁴⁸.

O Brasil é um país com grande capacidade de produção de pescado e outros produtos da aquicultura, já que possui um litoral com extensão de 7.367 km, banhado a leste pelo oceano Atlântico, e extensa bacia hidrográfica se comparado a outros países do mundo⁴⁹.

Diante da potencial expansão da capacidade de produção do pescado, e importância dessa matriz alimentar do ponto de vista econômico e de saúde, a produção de alimentos com fatores mínimos de segurança tornam-se de fundamental importância.

O pescado pode ser contaminado uma grande variedade de microrganismos, através principalmente, pelo contato direto dos peixes com água de baixa qualidade microbiológica. O pescado vivo, por sua vez, apresenta contaminação bacteriana principalmente na pele, brânquias e escamas, passando aos demais tecidos após a morte do animal. Desta forma, as práticas de manejo no ambiente de criação e processamento são importantes fatores de risco que podem resultar no desenvolvimento e manutenção dos patógenos, presentes no próprio pescado ou provenientes do ambiente⁵⁰.

REFERÊNCIAS

1. CDC - Centers for Disease Control and Prevention: Foodborne Outbreak. Database 2017 [Internet]. Centers for disease Control and Prevention (US).
2. EFSA- European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA J.[online] 2017; 15(12):1-228.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil [online] Brasília: Ministério da saúde, 2018.
4. Sanjee SA, Karim ME. Microbiological Quality Assessment of Frozen Fish and Fish Processing Materials from Banglades. Int. J. Food Sci. [online] 2016; 1-6.
5. Brasil. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa pecuária Municipal. 2017.
6. IMPRESSO GUANDONG CHINA
7. Cosby DE, Cox NA, Harrison MA, Wilson JL, Jeff Buhr R, Fedorka-Cray PJ. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review. J. Appl. Poult. Res. [online] 2015; 1-19.
8. Chlebicz A, Slizewska K. Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. Int. J. Environ. Res. Public Health [online] 2018; 15: 1-29.
9. Ameya G, Tsalla T, Getu F, Getu E. Antimicrobial susceptibility pattern, and associated factors of *Salmonella* and *Shigella* infections among under five children in Arba Minch, South Ethiopia. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. [online] 2018; 17(1): 1-7.
10. Trabulsi LR, Alterthum LF. Microbiologia. 4a ed. São Paulo: Atheneu, 2004:678p.
11. ICMSF – International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in Foods. 5ª ed. London: Blackie Academic and professional, 1996. 513p.
12. Murmann L, Santos MC, Cardoso M. Prevalence, genetic, characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. Food Control. [online] 2009; 20(3); 191-195.
13. Bailey S, Richardson LJ, Cox NA, Cosby DE. *Salmonella* In: Juneja VK, Sofos JN. Pathogens and toxins in foods: Challenges and Interventions. Cap.07. Washington DC: ASM Press, 2010.
14. Townsend SM, Kramer NE, Edwards R, Baker S, Hamlin SM, Simmonds M, Stevens K, Maloy S, Parkhill J, Dougan G, Bäumlér A. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. Infect Immun [online]. 2001; 69(5): 2894-2901.
15. Schwartz KJ. Salmonellosis in: Straw BE, D'allaires S, Mengeling WL.; Taylor DJ. Disease Swine. 8th ed. Ames: Iowa University Press, 2000. p.535-551.

16. Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. Biofilm form abilities *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. BMC. Vet. Reschr. [online]. 2009; 5(20): 1-6.
17. Fàbrega A, Villa J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. Clin Microbiol. Rev. [online]. 2013; 26(2): 308-341.
18. Goosney DL, Knochel DG, Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella* and *Shigella*: Master of host cell cytoskeletal exploitation. Emerg Infect Dis [online]. 1999; 5(2): 216-223.
19. Jay MJ. Microbiologia de Alimentos. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005:711p.
20. Ohl ME, Miller SI. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. Annu Rev Med [online]. 2001; 52: 259-274.
21. Wagner C, Hensel M. Adhesive mechanisms of *Salmonella enterica*. Adv. Exp. Med. Biol. [online]. 2011; 715: 17-34.
22. Gonzales AM, Wilde S, Roland KL. New Insights into the Roles of Long Polar Fimbriae and Stg Fimbriae in *Salmonella* Interactions with Enterocytes and M Cells. Infect. Immun. [online]. 2017; 85(9): 1-12.
23. Ochoa IMF, Rodriguez AV. Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Review Article [online]. 2005; 47(1-2): 25-42.
24. Marcus SL, Brumell JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* Pathogenicity islands: big virulence in small packages. Microbes Infect [online]. 2000; 2(2): 145-156.
25. Kim SI, Kim S, Kim E, Hwang SW, Yoon H. Secretion of *Salmonella* Pathogenicity Island 1-Encoded Type III Secretion System Effectors by Outer Membrane Vesicles in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. Front. Microbiol. [online]. 2018; 9: 1-13.
26. Galán JE, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: Homology of *InvA* to members of a new protein family. J Bacteriol [online]. 1992; 174(13): 4338-4349.
27. Al-Habsi K, Jordan D, Harb A, Laird T, Yang R, O'Dea M, Jacobson C, Miller DW, Ryan U, Abraham S. *Salmonella enterica* isolates from Western Australian rangeland goats remain susceptible to critically important antimicrobials. Sci. Rep. [online]. 2017; 8(1): 1-11.
28. Lucas LR, Lee AC. Roles of *hilC* and *hilD* in Regulation of *hilA* Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. J. Microbiol [online]. 2001; 183 (9): 2733-2745.
29. Karasova D, Sebkova A, Havlichova H, Sisak F, Volf J, Faldyna M, Ondrachova P, Kummer V, Rychlik I. Influence of major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. BMC Microbiol [online]. 2010; 10(72): 1-11.
30. Ochoa IMF, Rodriguez AV, Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella* sp. Ver.Arte. [online]. 2005; 47(2): 25-42.

31. Karasova D, Havlickova H, Sisak F, Rychlik I. Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *BMC Microbiol* [online]. 2010; 10(72): 1-11.
32. Sheppard M, Webb C, Heath F, Mallows V, Emilianus R, Maskell D, Mastroeni P. Dynamics of bacterial growth and distribution within the live during *Salmonella* infection. *Cell. Microbiol.* [online]. 2013; 5(9); 593-600.
33. CDC - Centers for Disease Control and Prevention: National Antimicrobial resistance Monitoring System: Enteric Bacteria (NARMS). Human Isolates Final Report. [Internet]. Centers for disease Control and Prevention (US). 2004.
34. Miriagou V, Carattoli A, Fanning S. Antimicrobial resistance islands: resistance genes clusters in *Salmonella* Chromosome and plasmids. *Microbs. Infect.* [online]. 2006; 8(7): 1923-1930.
35. Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance their clinical relevance in the new millennium. *Drugs.* [online]. 2002; 62(4): 557-566.
36. Songe MM, Hang'ombe BM, Knight-Jones TJD, Grace D. Antimicrobial Resistant Enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Houseflies Infesting Fish in Food Markets in Zambia. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* [online]. 2017; 14(21): 1-10.
37. Clément M, Ramette A, Bernasconi OJ, Principe L, Luzzaro F, Endimiani A. Whole-Genome Sequence of the First Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Strain of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Napoli. *Microbiol. Resour. Announc.* [online]. 2018; 7(10): 1-13.
38. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin. Infect. Dis.* [online]. 2005; 41: 20-26.
39. Tagg K, Francois Watkins L, Moore MD, Bennett C, Joung YJ, Chen JC, Folster JP. Novel trimethoprim resistance gene *dfrA34* identified in *Salmonella* Heidelberg in the USA. *J. Antimicrob. Chemother.* [online]. 2019; 74(1): 38-41.
40. Gillings MR. *Integrans*: Past, Present, and Future. *Microbiol. Mol. Biol.* [online]. 2014; 78(2): 257-277.
41. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics. *Antimicrob Agents Chemother* [online]. 2001; 45(3): 723-726.
42. Le'vesque C, Piche L, Larose C, Roy P. PCR Mapping of *Integrans* Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *ANTIMICROB AGENTS CHEMOTHER* [online]. 1995; 39(1): 185-191.
43. Hall R, Brookes D, Stokes H. Site-specific insertion of genes into *Integrans*: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol. Microbiol.* [online]. 1991; 5(8):1941-1959.

44. Hall RM, Collis CM. Mobile gene cassettes and *Integrans*: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* [online].1995; 15(4): 593–600.
45. Lopes GV, Michael GB, Cardoso M, Schwarz S. Antimicrobial resistance and class 1 *Integron*-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. *Vet Microbiol* [online]. 2016; 194:84-92.
46. Okamoto, AS. Detecção dos genes *Integron*, *invA* e *spvC* em *Salmonella Enteritidis* proveniente de material avícola e transferência horizontal do gene *Integron* entre enterobactérias [Tese]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia; 2009.
47. Neiva, CRP. Cresce interesse pelos aspectos nutricionais do pescado. *Inst pesca.* 2010;7.
48. FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura: Consumo de pescado na América Latina e no Caribe crescerá 33% até 2030 [Internet]. 2012.
49. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: Atlas nacional do Brasil. 3. ed. Rio de Janeiro: IBGE, 2000.
50. FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura: Proceedings of the Global Conference on Aquaculture. [Internet]. 2010.

CAPITULO 2

ISOLAMENTO CONVENCIONAL, SOROTIPIFICAÇÃO, PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS, *Integron* DE CLASSE 1 E *gyrA* EM *Salmonella* sp. ISOLADOS EM PESCADO.

RESUMO

Objetivou-se com este trabalho, realizar o isolamento de *Salmonella enterica* de amostras de pescados oriundos de criadouro localizados nos estados de Goiás e Tocantins obtidas entre os anos de 2015 e 2017, por metodologia convencional e identificar os sorovares. Realizar verificação do perfil de suscetibilidade de *Salmonella enterica*. para Ácido nalidixico (30µg), ampicilina (10mg), cefotaxima (30µg), ceftriaxona(30µg), ciprofloxacina(5µg) e sulfametazol trimetropim (5µg), utilizados tanto na medicina humana quanto veterinária, identificar a presença de isolados com perfis de multirresistência à antibióticos, detectar a presença do *Integron* de classe 1 e analisar a associação entre a presença do *Integron* de classe 1 e a resistência antimicrobiana dos sorovares de *Salmonella enterica*, e detecção do gene *gyrA* dos isolados oriundos de pescado. Isolados entre os anos de 2015 e 2017, foram obtidos de bacterioteca, mantida pelo CPA/EVZ/UFG. Foram avaliados 41 isolados de *Salmonella enterica*, oriundos de pescado e distribuídos entre esses, foram definidos dez tipos de sorovares. A maior frequência de resistência foi observada para ácido nalidíxico, 50% (21/42), seguido por cefotaxima e ampicilina, com 35,7% cada (15/42), ceftriaxona 28,7% (12/42), sulfametazol trimetropim 21,4% (9/42), e ciprofloxacino 14,2% (6/42). Foram identificados 17 perfis de resistência à antimicrobianos e 50% (21/42) dos isolados apresentaram multirresistência. O *Integron* de Classe 1 foi detectado em 69% (29/42) dos isolados. Apesar de número considerável de detecções, a presença do *Integron* de classe 1 não está diretamente associado com os níveis de resistência à antimicrobianos. O gene *gyrA*, foi observado em 32 (78%) dos isolados.

Palavras-chave: Microrganismos, Genotípico, Multirresistência, Alimento, Resistência.

CONVENTIONAL ISOLATION, SOROTYPING, PROFILE OF SUSCEPTIBILITY TO ANTIMICROBIALS, CLASS 1 INTEGRON AND *gyrA* IN *Salmonella* sp. ISOLATED IN FISH.

ABSTRACT

The objective of this work was to isolate *Salmonella enterica* from fish samples from farms located in Goiás and Tocantins states obtained between 2015 and 2017 by conventional methodology and to identify the serovars. Carry out verification of the susceptibility profile of *Salmonella enterica*. (30 µg), ceftriaxone (30 µg), ciprofloxacin (5 µg) and trimethoprim sulfamethozol (5 µg), both in human and veterinary medicine, to identify the presence of isolates with to detect the presence of *Integron* of class 1 and to analyze the association between the presence of *Integron* of class 1 and the antimicrobial resistance of serovars of *Salmonella enterica* and detection of the gene *gyrA* of the isolates from fish. Isolated between the years of 2015 and 2017, were obtained from bacterioteca, maintained by CPA / EVZ / UFG. Thirty-one isolates of *Salmonella enterica* from fish and distributed among these were defined ten types of serovars. The highest frequency of resistance was observed for nalidixic acid, 50% (21/42), followed by cefotaxime and ampicillin, with 35.7% each (15/42), ceftriaxone 28.7% (12/42), trimethoprim sulfamethazole 21.4% (9/42), and ciprofloxacin 14.2% (6/42). Seventeen antimicrobial resistance profiles were identified and 50% (21/42) of

the isolates presented multiresistance. *Integron* Class 1 was detected in 69% (29/42) of the isolates. Despite the considerable number of detections, the presence of Integron class 1 is not directly associated with antimicrobial resistance levels. The *gyrA* gene was observed in 32 (78%) of the isolates.

Keywords: Microorganisms, Genotypic, Multiresistance, Food, Resistance.

INTRODUÇÃO

Apesar da maioria dos casos de salmonelose serem associados ao consumo de produtos avícolas, os produtos oriundos da piscicultura, também são alimentos veiculadores em potencial desse microrganismos, já que em sua composição natural, possui elementos essenciais para manutenção e sobrevivência de *Salmonella enterica*, associado ao agravo de que muitos pratos preparados com essa matriz alimentar são consumidos crus, ou seja, não sendo submetidos a cocção que poderia ser um fator que contribuísse para a eliminação de *Salmonella enterica* presente no alimento¹.

Segundo dados preliminares do CDC², para ano de 2017 nos Estados Unidos, a incidência de dos casos de salmonelose não sofreu grande variação quando comparada aos índices dos anos anteriores, onde entre os anos 2000 e 2015 foram registrados 2150 surtos da doença. De acordo com Sistema de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VEDTA³ no período entre 2014 e 2017 foram registrados no Brasil 85 surtos de doenças veiculadas por alimentos tendo como agente etiológico, *Salmonella* sp., acometendo 3.433 pessoas.

Além *Salmonella enterica*, estar relacionada como agente etiológico de grande parte das doenças veiculadas por alimentos, preocupa-se com o fato do número crescente de cepas isoladas resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos o que conseqüentemente aumenta seu potencial patogênico⁴. O uso indiscriminado de antibióticos em animais como estratégia de produção ou terapêutica, associado à capacidade do patógeno de transmissão de genes de virulência entre si e evolução de populações bacterianas resistentes, contribuem diretamente para o perfil de resistência mencionado anteriormente^{4,5}.

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana, aliado à pesquisa da presença de genes de resistência desempenham papel fundamental na orientação terapêutica de casos de doenças veiculadas por alimentos e fornecem importantes dados no que tange aspectos de vigilância epidemiológica⁶.

Os genes que garantem à *Salmonella enterica* um perfil crescente de resistência à antimicrobianos, podem estar localizados no DNA cromossomal da bactéria, como em um fragmentos de DNA que abrigam de maneira integrada, genes de resistência, sendo esses definidos como *Integrans*, elementos que podem ser detectados em elementos móveis, como plasmídeos, podendo dessa maneira, serem transferidos entre bactérias, ou ainda estar localizado no DNA cromossomal⁷.

O *Integron* de classe 1 é um complexo de genes localizado na ilha genômica cromossomal 1 de *Salmonella*, que normalmente é um elemento presente em cepas que apresentam perfis de multirresistência à antibióticos^{8,9}. Na região variável do *Integron* de classe 1, se encontram diferentes *cassets* de genes incluindo os genes *aad*, *dfr*, e *bla* que expressam resistência para bases como aminoglicosídeos, trimetoprima e β -lactâmicos^{10,11}.

Portanto, o monitoramento contínuo de resistência em sorovares de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos torna-se necessário devido às implicações na saúde pública por uma potencial disseminação de microorganismos resistentes.

Pelo exposto, objetivou-se com este trabalho, realizar a pesquisa de *Salmonella enterica* em produtos de pescado, por meio de isolamento convencional, realizar caracterização antigênica com consequente determinação de sorovar por meio de sorotipificação, verificar o perfil de suscetibilidade de *Salmonella enterica* isolados em pescado para seis antimicrobianos utilizados tanto na medicina humana quanto animal, identificar a presença de isolados com perfis de multirresistência, realizar detecção do *Integron* de classe 1 nos isolados e analisar a associação entre a presença deste e a resistência antimicrobiana.

MATERIAL E METODOS

Isolados

Os isolados foram obtidos de bacterioteca, mantida pelo CPA/EVZ/UFG. Os isolados, oriundos de pescado, foram isolados entres os anos de 2015 e 2017 e mantidos em ágar nutriente. Neste estudo foram avaliados 41 isolados, de origem de diferentes criadouros do Brasil.

Após seleção na bacterioteca, os isolados foram ressuspensos em caldos de enriquecimento seletivo e posteriormente isolados em placas, para obtenção de colônias puras que foram utilizadas como objeto desse estudo.

Sorotipificação

Com intuito de caracterização antigênica, os isolados que apresentaram os resultados de testes convencionais característicos de *Salmonella* sp. foram semeados em Ágar Nutriente (Difco, USA) e enviados para o Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz–RJ.

Suscetibilidade a antimicrobianos

Os testes de susceptibilidade antimicrobiana foram realizados pela técnica de difusão em disco de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) diretriz M02-A11¹³. Os isolados repicados em XLT4 (Difco, USA) foram utilizados para realização do antibiograma. Uma colônia contida no ágar foi repicada em 5 mL de caldo BHI (Difco, USA) e incubada a 37°C até se obter turvação de acordo com a escala de *MacFarland*.

Após turvação, o caldo com a amostra foi semeado em placas de ágar *Mueller-Hinton* (Difco, USA), utilizando suabes estéreis. Os discos com antimicrobianos para realização do teste de susceptibilidade foram inseridos nas placas e incubados a 37°C por 18 horas. Os resultados foram interpretados de acordo com as zonas de inibição estabelecidas para *Enterobacteriaceae*, e os isolados identificados como suscetíveis, intermediários ou resistentes de acordo com as diretrizes do M100-S24¹⁴. Os seguintes antimicrobianos foram avaliados: Ácido nalidixico, ampicilina, cefotaxima, ceftriaxona, ciprofloxacina e sulfametazol trimetropim. Foram caracterizados como isolados multirresistentes os

microrganismos que apresentem resistência a pelo menos duas classes de agentes antimicrobianos.

Extração de DNA cromossomal

Os isolados criopreservados, foram resuspendidos em caldo BHI (Difco, USA), onde foram encubados pelo prazo de 24 horas. Após incubação de todos os isolados, foram pipetadas alíquotas de 1,5 mL e submetidas à centrifugação 13000 rpm por 30s. Em seguida, foi realizada a extração do DNA cromossomal, utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®, USA), seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

O DNA eluido foi armazenado em freezer a -80°C até o momento da realização da PCR em tempo real.

Extração de DNA plasmidial

Os isolados criopreservados, foram resuspendidos em caldo *Luria-Bertani* (LB), onde foram encubados pelo prazo de 24 horas. Em seguida, foram pipetadas alíquotas de 1,5 mL e submetidas à centrifugação 13000 rpm por 30s, e descarte do sobrenadante. O sedimento celular foi ressuspendido em 600 µL de água deionizada.

Após a ressuspensão do sedimento celular, foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep system* (Promega®, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Após o processo de extração, foi obtido 30 uL de filtrado, sendo então armazenado em freezer a -20°C, até o momento da realização da PCR em tempo real.

Quantificação do DNA extraído

As concentrações dos DNAs cromossomais e plasmidiais extraídos foram verificadas em nanofotômetro (Nanophotometer® P300, Impln GmbH®, Munique, Alemanha), com leitura nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

Detecção do gene de resistência e *Integron* de classe 1

A detecção do *gyrA* e *Integron* de classe 1 foi realizada por PCR em tempo real.

Os iniciadores utilizados estão dispostos no Quadro 1.

Quadro 1 - Sequência de iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real

Gene	Iniciador	Referência	Localização do gene
<i>gyrA</i>	Senso - 5' TGTCCGAGATGGCCTGAAGC 3'	Arguello ¹² .	
	Antissenso - 5' TACCGTCATAGTTATCCACG 3'		
<i>Integron</i> de classe 1	Senso - 5' GGCATCCAAGCAGCAAG 3'	Lévesque et al. ¹³	Cromossomo Plasmídeo
	Antissenso - 5' AAGCAGACTTGACCTGA 3'		

Para realização do PCR em tempo real utilizou-se o volume de reação de 20µL, contendo 12.5µL de GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, USA), 0,2 µL para cada primer (1µM concentração), 5,1µL de água sem nuclease e 2µL de DNA da amostra. A reação realizada no equipamento Step One Plus – Real Time PCR System (Applied Biosystem, USA). Como controle positivo foi utilizado DNA de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), e como controle negativo foi adicionado água no lugar de DNA, tendo sido incluídos em cada reação. Para amplificação do DNA no termociclador foram utilizadas quatro etapas: Dois minutos de aquecimento inicial para ativação enzimática a 95°C, 30 segundos para desnaturação a 95°C, 30 segundos para anelamento a 60°C e um minuto para extensão a 74°C, as etapas de desnaturação anelamento e extensão foram repetidas em um total de 40 ciclos e 15 segundos a 95°C, um minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C para dissociação, obtendo-se a curva de melt da reação de cada amostra.

Análise estatística

A existência de associação entre a presença da região variável do *Integron* de classe 1 e a resistência à antibióticos e ao número destes foi determinada pelo teste de Qui-quadrado de Pearson.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Isolados e sorotipificação

Das amostras de pescado avaliadas para pesquisa de *Salmonella* sp., entre os anos de 2015 e 2017, foram obtidos por meio de isolamento convencional, 41 isolados, de diferentes produtos de pescado (Quadro 2).

A análise de sorovores obtida, mostra que disperso entre os 41 isolados, estão presentes 10 sorovares distintos de *Salmonella* sp, são eles: *Salmonella enterica* sorovar Gafsa (03 isolados), *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (06 isolados), *Salmonella enterica* sorovar Anatum (01 isolado), *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (19 isolados), *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:4,5:-:1,2 (03 isolados), *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:4,5 (04 isolados), *Salmonella enterica* subespécie *enterica* rugosa(02 isolados), *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:6,7 (01 isolado), *Salmonella enterica* sorovar Tennessee (01 isolado) e *Salmonella enterica* sorovar Agona (01 isolado). A distribuição de sorovares por amostra está abaixo no Quadro 2.

Quadro 2- Sorovares de *Salmonella* sp. identificados em isolados oriundos de pescado.

Pescado	Sorovar	Ano
Tambaqui	Heidelberg	2015
Caranha	Gafsa	2015
Tambaqui	Anatum	2015
Caranha	O:4,5:-:1,2	2015
Tambaqui	Typhimurium	2015
Tambaqui	Typhimurium	2015
Tambaqui	O:4,5:-:1,2	2015
Píau	Heidelberg	2015
Pintado	O:4,5:-:1,2	2015
Tilápia	Rugosa	2015
Tambaqui	Tennessee	2015
Tambaqui e	Heidelberg	2015

Quadro 2- Sorovares de *Salmonella* sp. identificados em isolados oriundos de pescado

Pescado	Sorovar	Ano
Tambaqui	Heidelberg	2016
Tambaqui	Heidelberg	2016
Pescado fresco	Heidelberg	2016
Matrinxã	Heidelberg	2016
Tambaqui	Heidelberg	2016
Matrinxã	Gafsa	2016
Caranha	Gafsa	2016
Matrinxã	Agona	2016
Tambaqui	O: 4,5	2016
Pacu	Heidelberg	2016
Tambaqui	Heidelberg	2016
Banda de Tambaqui	Heidelberg	2016
Caranha	Typhimurium	2016
Matrinxã	Rugosa	2016
Pintado	O:4,5	2016
Tambaqui	Typhimurium	2016
Tambaqui	Heidelberg	2016
Tambaqui	Heidelberg	2017
Matrinxã	Typhimurium	2017
Tambaqui	Typhimurium	2017
Tambaqui	O:4,5	2017
Tambaqui	O:4,5	2017
Tambaqui	Heidelberg	2017
Pintado	Heidelberg	2017
Tambaqui	Heidelberg	2017
Curimba	O:6,7	2017
Tambaqui	Heidelberg	2017
Matrinxã	Heidelberg	2017
Tambaqui	Heidelberg	2017

Por não ser considerado um microrganismo naturalmente isolado em peixes, a presença de *Salmonella* sp. nessa matriz alimentar, é diretamente relacionada à qualidade da água dos criadouros já que a microbiota encontrada em pescado reflete diretamente os níveis de poluentes dispersos na água a qual são criados, onde quanto mais poluída, maior a diversidade de microrganismos potencialmente patogênicos isolados^{14,15}.

Outros fatores que podem ser atribuídos ao número de isolados encontrados nesse estudo podem ser atribuídos à localização das represas utilizadas para criação dos peixes, que

pode facilitar o escoamento de águas residuais resultantes de chuvas, e ou práticas higiênicas inadequadas como a drenagem de esgoto e de animais para o ambiente de criação¹⁶.

A criação de peixes, associada a outras práticas pecuárias, como a criação de bovinos e suínos e utilização de esterco e ou cama de frango, como meio de fertilização dos tanques de criação de peixes, são práticas que promovem um aumento significativo do números de microrganismos indesejáveis na água utilizada. Outro fator agravante é de que nas situações descritas anteriormente, o peixe terá contato direto, por meio das guelras com grande carga microbiana, que se disseminará rapidamente pelo seu organismos por via sanguínea^{16,17}.

As práticas incorretas de manejo, como superlotação em tanques e dietas desequilibradas, são apontadas por diversos autores como elementos de interferência direta nos níveis de contaminação por agentes patogênicos em pescado, isso porque são fatores que aumentam o nível de stress dos animais em ambientes de criação, o que estimula quebra da homeostase do status imunológico dos animais o que conseqüentemente, dimui a eficiência da contenção do patógeno¹⁸.

Assim como no ambiente de criação, as práticas de manejo do pescado durante seu processamento em ambiente industrial, interferem diretamente na qualidade do produto final e nos níveis de qualidade microbiológica. Para evitar contaminações, boas práticas de fabricação devem ser adotadas em todas as etapas de processamento, como higiene das superfícies de contato direto com os peixes, práticas higiênicas dos colaboradores e utilização de água potável e clorada¹⁹.

Quando a adoção de práticas hígienas do ambiente de processamento se mostram ineficientes, a formação de biofilmes por parte de *Salmonella* sp. pode ocorrer, o que mantém a bactéria viável nas superfícies de contato industrial, sendo um fômite em potencial de processos de contaminação cruzada^{20,21}.

Quanto à circulação de sorovares, Santos²², afirma que esse fator, é influenciado diretamente pelo modo de criação do pescado característico de diferentes regiões e que em alguns países sorotipos Typhimurium e Enteritidis são os mais prevalentes, o que demonstra similaridade com esse estudo, onde o sorovar Typhimurium, foi o de segunda maior ocorrência entre os isolados.

Estudo realizado por Rahimi et al.²³, que avaliou a presença de *Salmonella* sp. em pescado fresco no Irã, detectou entre os 19 isolados obtidos, cinco tipos distintos de sorovares, sendo eles: Typhimurium, Enteritidis, Typhi, Paratyphi B e Newport. Neste estudo foram identificados dez sorovares circulantes, entre os 41 isolados.

No Brasil, Duarte et al.¹⁹, se propuseram a avaliar dentre outras variáveis, a frequência de isolamento de *Salmonella* sp. em pescado da região nordeste do Brasil, obtendo como resultado a presença desse microrganismo em 5% dos isolados. Ao avaliar a pesquisa de *Salmonella* sp. em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo, Liuson²⁴, isolou o microrganismos em 7,8% das amostras avaliadas.

No ano de 2011, Martins²⁵, não obteve isolados de *Salmonella* sp. oriundos da pesquisa de avaliação dos parâmetros de qualidade de pescado na cidade de São Paulo. Resultados negativos para a pesquisa desse mesmo microrganismos também foram obtidos por Damasceno²⁶ e Soares et al,²⁷.

Suscetibilidade antimicrobiana

Para as bases de antimicrobianos testadas, os isolados apresentaram maior resistência para o ácido nalidíxico, com um índice de 51,2% de resistência, 12,2% de resistência intermediária e 39% de isolados sensíveis à essa base. Cefotaxima e ampicilina, foram os antibióticos que apresentaram o segundo maior índice de resistência, totalizando 36,5% de resistência. Ainda para os antibióticos mencionados anteriormente, ambos apresentaram mesmo índice de grau de sensibilidade e resistência intermediária, onde 58,5% foram sensíveis e 7,3% resistência intermediária.

Para ceftriaxona, o resultado obtido aponta que 29,2% dos isolados expostos a essa base foram resistentes a sua ação antimicrobiana, onde ainda 7,3% demonstraram resistência intermediária e 65,8% de sensibilidade. Sulfametoxazol Trimetropim, foi a base de antibiótico que apresentou o maior índice de sensibilidade frente aos antibióticos testados, totalizando um percentual de 80,4% dos isolados sensíveis à ação antimicrobiana, com 21,9% de resistência e nenhum perfil de resistência intermediária.

Dos antibióticos testados, ciprofloxacino foi a base que apresentou menor índice de resistência, totalizando 14,6%. Em contrapartida essa base apresentou o maior índice de resistência intermediária, 48,7% e sensibilidade de 39%.

Os resultados descritos acima, estão dispostos abaixo na Tabela 1.

Tabela 1 – Suscetibilidade a antimicrobianos de *Salmonella enterica* isolados em produtos de pescado

Antimicrobianos	Sensível	Intermediário	Resistente
Ácido Nalidixico	16(39,00%)	5(12,2%)	21(51,2%)
Cefotaxima	24(58,5%)	3(7,3%)	15(36,5%)
Ampicilina	24(58,5%)	3(7,3%)	15(36,6%)
Ceftriaxona	27(65,8%)	3(7,3%)	12(29,2%)
Sulfametoxazol Trimetropim	33(80,4%)	-	9(21,9%)
Ciprofloxacino	16(39%)	20(48,7%)	6(14,6%)

Demonstrando similaridade a este estudo, Broughton and Walker²⁸, demonstraram nível de resistência de isolados de *Salmonella* sp., em pescado, oriundos na cidade de Guandong na China, de 40% para o ácido nalidixico, porém diferentemente deste trabalho, esta não foi a base de maior nível de resistência encontrada, sendo essas eritromicina e ampicilina com 100% de resistência para ambas.

Estudo que buscou avaliar a presença e o perfil de *Salmonella* sp. do pescado oriundo da costa marroquina, constatou que dentre os isolados, o maior índice de resistência foi atribuído à ampicilina (49,1%)²⁹, índice mais elevado do que o presente estudo, onde esta

base apresentou o segundo maior nível de resistência juntamente com cefotaxima. Para ácido nalidixico Setti et al.²⁹, obteve um índice de resistência de 15,7% e para sulfonamida de 3,5%.

Elhadi et al.³⁰, avaliaram o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos em um total de 140 isolados de *Salmonella*, de seis tipos diferentes de peixes de água doce congelados, oriundos de cinco países e obteve como resultados, resistência à tetraciclina (90,7%), seguida por ampicilina (70%), amoxicilina e ácido clavulânico (45%).

Ao avaliarmos os níveis de resistência do ciprofloxacino obtidos nesse estudo, essa base quando comparada às demais testadas, apresenta menor percentual de isolados resistentes. Porém, se considerarmos os níveis intermediários de resistência e o somarmos ao percentual de definitivamente resistentes, ciprofloxacino apresentara nível de resistência equivalente ao observado para ácido nalidixico, alcançando um índice de 63,3% de resistência, enquanto ácido nalidixico teria um percentual de resistência de 62,2%.

Esses resultados, corroboram com os encontrados por Hakanen et al.³¹, que observaram que, mutação pontual na região determinante da resistência à quinolona (QRDR) do gene da topoisomerase *gyrA* (aminoácidos 67 a 122) em *Salmonella* geralmente leva simultaneamente à resistência ao ácido nalidíxico, uma quinolona de fluoreto estreito não fluorado e à diminuição da suscetibilidade à ciprofloxacina.

Os beta lactâmicos, como ampicilinas e cefalosporinas que incluem, ceftriaxona e cefotaxima, são uma das principais opções de tratamento para a salmonelose invasiva, no entanto, sua resistência progressiva observada em vários países preocupa as autoridades de vigilância em saúde³². O percentual de isolados de *Salmonella* sp. resistentes à cefotaxima e ceftriaxona, encontrados por McCollister et al.³³, de aproximadamente 32% para as duas bases, demonstram similaridade aos respectivamente, 35,7% e 28,7% de resistência observados nesse estudo.

Ao avaliar a susceptibilidade a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isolados de diferentes produtos de origem animal, Zhang et al.³⁴, encontrou valores mais elevados de resistência à diferentes bases quando comparado aos observados nesse trabalho. Os valores encontrados neste foram, a resistência a ampicilina (84,9%), resistência dos antibióticos quinolonas foram todas acima de 50%, incluindo resistência ao ácido nalidíxico (77,3%), ciprofloxacina (64,8%). As taxas de resistência às cefalosporinas variaram de 17,6 a 76,7%, com altas taxas de resistência à ceftriaxona (76,7%) e cefotaxima (47,2%).

Dos 41 isolados testados quanto a suscetibilidade às seis bases de antimicrobianos descritas no presente estudo, 21 (51,2%) apresentaram perfil de multirresistência, ou seja, se mostraram resistentes a duas ou mais bases de antibióticos, sendo que uma delas apresentou resistência a todas as bases testadas.

Os perfis de resistência à antimicrobianos levando em consideração os sorovares de *Salmonella* sp. estão dispostos abaixo no Quadro 3.

Quadro 3 - Perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella enterica* isolados de pescado.

Sorovar	Bases com perfil de resistência	Quantidade de isolados
Heidelberg	NAL	2
	AMP	1
	AMP, CIP	1
	SUT, NAL	1
	NAL, AMP	1
	CTX, SUT, NAL	1
	CTX, SUT, CIP	1
	CTX, SUT, NAL, CRO	1
	CTX, SUT, NAL, AMP	1
	CTX, NAL, CRO, AMP	2
	CTX, SUT, NAL, CRO, AMP	1
	CTX, NAL, CRO, AMP, CIP	1
	CTX, SUT, NAL, CRO, AMP, CIP	1
Typhimurium	NAL	1
	NAL, CRO	1
	NAL, AMP, CIP	1
	CTX, NAL, CRO, AMP	1
<i>Enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	AMP	1
	CTX, NAL, CRO	1
	CTX, NAL, AMP	1
	CTX, SUT, NAL, CRO	1
	CTX, NAL, CRO, AMP, CIP	1
Gafsa	CTX, CRO	1
	NAL, CIP	1
Agona	CTX, SUT, NAL, CRO, AMP	1

Ainda para o perfil de suscetibilidade, 12 (29,2%) dos 41 isolados isolados, apresentaram perfil de 100% de sensibilidade às bases testadas. Os sorovares de *Salmonella enterica*, que apresentaram essa característica, estão dispostos abaixo no Quadro 4.

Quadro 4 – Sorovares de *Salmonella enterica* oriundos de pescado com perfil de sensibilidade total às bases testadas.

Sorovar	Quantidade de isolados
Heidelberg	4
Typhimurium	3
<i>Enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	2
Gafsa	1
Anatum	1
Tennessee	1

Para o sorovar Heidelberg, foram determinados Foram identificados 13 perfis de resistência a antimicrobianas, sendo que dos 19 isolados pertencentes a esse sorovar, 15 ou 78,9%, apresentaram resistência ao menos para uma base de antimicrobiano. Os isolados pertencentes aos sorovares Typhimurium e *entérica* subsp. *entérica*, apresentaram respectivamente 83,3% e 50% de isolados resistentes a pelo menos uma base de antibiótico. Do sorovar Agona, dois isolados ou 66,6% apresentaram resistência a duas bases de antimicrobiano e um isolado 100% sensível a todas as bases testadas. O único isolado pertencente ao sorovar Agona, apresentou perfil de resistência para cinco das seis bases testadas.

Os sorovares Anatum e Tennessee, foram identificados em um isolado cada, e ambos apresentaram 100% de sensibilidade frente aos antibióticos testados. Os sorovares Heidelberg, Typhimurium, *Enterica* subsp. *enterica* e Gafsa, também apresentaram dentre seus isolados, aqueles que resultaram em perfil de sensibilidade total às bases avaliadas.

A presença de isolados de *Salmonella* sp. multirresistentes, é um fator de preocupação mundial, já que apresenta índices crescentes de prevalência de cepas circulantes com essa característica à, oriundos de diferentes matrizes alimentares e de diversos países, o que é considerado um fator potencial de risco para o status de saúde pública e eficiência de tratamentos que exigem intervenção medicamentosa³⁵.

No estudo publicado por Abakp et al.³⁶, por meio de avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *Salmonella* sp. isolados de produtos frescos, observou que 100% dos isolados apresentaram perfis de multirresistência e que esse fato demonstra relação direta de atenuação da virulência, quando comparadas a outros isolados que não apresentam perfil de multirresistência.

Ao avaliar a prevalência e susceptibilidade a antimicrobianos de *Salmonella* sp., isolados de prescado congelados do comércio varejista árabe, Elhadi³⁷, além de níveis

relevantes de resistência para as bases de antimicrobianos testadas, relatou um nível de multirresistência de 45%, similar ao percentual de isolados multirresistentes desse estudo.

No Brasil, Almeida et al.³⁸, de 90 linhagens de *Salmonella* sp. isolados de amostras clínicas e alimentos, 58,8% apresentaram resistência ao menos duas bases de antibióticos, enquanto que no estudo de Lopes et al.⁷ relataram que 60% dos isolados de *Salmonella enterica* apresentaram multirresistência, o que também se assemelha aos perfis determinados por este estudo.

Os resultados encontrados nesse estudo, aliado a pesquisas já publicadas, confirmam o fato da crescente resistência de *Salmonella* sp. frente à agentes antimicrobianos adicionados à diversidade de perfis de multirresistência constantemente relatados. Independente do sorovar, que possui variabilidade de circulação de acordo com a região avaliada, é eminente o risco a saúde pública representando por esse patógeno.

Estudos como esse, fomentam dados de vigilância epidemiológica e saúde no Brasil, o qual quando comparado a sistemas de vigilância de outros países, ainda é composto de dados que não condizem com a realidade, principalmente por casos subnotificados e processos de investigação epidemiológicas que não são concluídos.

Detecção *Integron* de classe 1

Dos 41 isolados de *Salmonella enterica* avaliados, a região conservada do *Integron* de Classe 1 foi detectada em 28 isolados ou 68,3%, sendo que todas as detecções foram observadas no DNA plasmidial. O DNA cromossomal dos isolados deste estudo, também foram submetidos a pesquisa da presença do *Integron* de classe 1, porém esse não se mostrou presente em nenhuma das amostras.

Estratificando os resultados da presença do *Integron* de classe 1 de acordo com os sorovares obtem-se os resultados mostrados abaixo na Tabela 2.

Tabela 2 - Frequência da região conservada do *Integron* de Classe 1 em *Salmonella enterica*. isolados em pescado, segundo sorovares

Sorovares	Nº de isolados	Positivos para região conservada do <i>Integron</i> de classe 1	% de positivos para a região conservada do <i>Integron</i> de Classe 1
Heidelberg	18	14	77,7
Typhimurium	7	5	71,42
<i>Enterica</i> subsp <i>enterica</i> O:4,5	4	3	75
<i>Enterica</i> subsp <i>enterica</i> O:4,5:-:1,2	3	2	66,6
Gafsa	3	1	33,33
<i>Enterica</i> subsp <i>enterica</i> (rugosa)	2	2	100
Agona	1	1	100
<i>Enterica</i> subsp <i>enterica</i> O:6,7	1	1	100
Anatum	1	0	0
Tennessee	1	0	0

Dentre os isolados de *Salmonella enterica*, oriundos de pescado deste estudo, a presença *Integron* de classe 1 não ocorreu somente em *Salmonella enterica* sorovar Anatum e *Salmonella enterica* sorovar Tennessee, que possuíam um isolado cada, dentre as 41 amostras. Vale ressaltar que os isolados referente a esses sorovares, resultaram ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos, 100% de sensibilidade frente às seis bases testadas nesse estudo. (Quadro 2).

Os sorovares que apresentaram maior frequência de detecção do *Integron* de classe 1, são respectivamente *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar rugosa, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:6,7, *Salmonella enterica* sorovar Agona, *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:4,5, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:4,5:-:1,2 e *Salmonella enterica* sorovar Gafsa. (Tabela 2).

Quando avaliado o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, dentre os 21 isolados que apresentaram perfil de multirresistência, em 14 deles ou em 66,6%, ocorreu a detecção de *Integron* de classe 1 em DNA plasmidial.

Os plasmídeos são elementos genéticos móveis, que carregam genes que expressam principalmente fatores de resistência para antibióticos, como *Integrans* que em sua região variável agrega conjuntos de genes de resistência³⁹. Os plasmídeos que

possuem *Integrans* de classe 1, como componente genético, frequentemente, apresentam perfil de multirresistência à antimicrobianos⁴⁰.

Estudo de Arguello et al.⁴¹, que avaliou, dentre outras variáveis, a presença de *Integron* de classe 1 em isolados de *Salmonella* sp. oriundos de suínos, identificaram a sequência em 77,4% dos isolados avaliados. Elevadas taxas, também foram determinadas por Ahmed et al.⁴² (80%) em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isolada de carne de frango e humanos no Egito, por Shu et al.⁴³ em isolados de *Salmonella* em humanos e animais em Taiwan (83,6%) e por Lindstedt et al.⁴⁴, que ao analisarem isolados de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium de amostras clínicas na Noruega, tiveram como resultado a presença do *Integron* de classe 1 em 97% dos isolados.

No Brasil, a determinação da presença do *Integron* de classe 1 em *Salmonella enterica*, também apresentaram resultados significativos em pesquisas como a de Ribeiro et al.⁴⁵, que detectaram a presença deste elemento em 45% dos isolados de *Salmonella enterica*, recuperada de alimentos e de Oliveira⁴⁶, que determinou a presença do *Integron* de classe 1, em 63,23% dos isolados de *Salmonella enterica* de origem avícola.

A presença de *Integron* de classe 1 no DNA cromossômico e/ou plasmidial de uma bactéria, é considerada por muitos pesquisadores um fator de influência direta na determinação de perfis de multirresistência frente a base de antimicrobianos, uma vez que possui integrado em sua região variável, diferentes genes de resistência^{47,48}.

Nesta pesquisa, a presença do *Integron* de classe 1 esteve associado somente à resistência dos isolados para ceftriaxona. Para os demais antimicrobianos avaliados, não houve associação ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Isolados de *Salmonella enterica* resistentes a antimicrobianos carregando *Integron* de classe 1

Agentes antimicrobianos	Nº (%) de isolados resistentes aos antimicrobianos (n=64)	Nº (%) de isolados resistentes a antimicrobianos carregando a região variável do <i>Integron</i> de Class 1 (n=29)
Ácido Nalidíxico	21 (32,81)A	10 (34,48)A
Ampicilina	15 (23,43)A	10 (34,48)A
Cefotaxima	15 (23,43) A	11 (47,82) A
Ceftriaxona	12 (18,75) A	12 (41,37) B
Sulfametoxazol	9 (14,06) A	6 (20,68) A
Trimetropim		
Ciprofloxacino	6 (9,37)A	3 (10,34)A

Letras diferentes na mesma linha indica que houve associação entre a presença do *Integron* de classe 1 e resistência antimicrobiana ($p < 0,05$).

Em oposição ao resultado encontrado nesse estudo, onde a presença do *Integron* de classe 1 teve relação direta com o perfil de resistência determinado para apenas uma, das seis bases avaliadas, estudos como o de Lu et al.⁴⁹, determinaram frequência crescente da taxa de resistência a múltiplas drogas em *Salmonella* em razão do aumento da prevalência de genes do *Integron* de classe 1 nos isolados.

Em concordância ao estudo de Lu et al.⁴⁹, a presença do *Integron* de classe 1, foi também considerado na pesquisa de Egualé et al.⁵⁰ um fator de influencia direta ao perfil de multirresistência observado em isolados de *Salmonella enterica* isolados de animais e humanos na Etiópia.

Resultados similares ao obtido neste trabalho, de baixa associação entre a presença de *Integron* de classe 1 e o perfil de resistência observado, ocorreram nas pesquisas de Srisanga et al.⁵¹, que avaliaram, o perfil genotípico e fenotípico de *Salmonella enterica* de origem canina e felina, e na pesquisa de Oliveira⁴⁷ que avaliou suscetibilidade a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella enterica* de origem avícola.

Apesar de reconhecidamente desempenhar importante papel nos perfis de resistência, observados em isolados de *Salmonella* sp., o *Integron* de classe 1 não é o único elemento genético capaz de influenciar tal característica. Outros elementos genéticos como *transposon* e plasmídeos, possuem a capacidade de carregarem genes que confirmam ao microrganismo perfis de resistência e/ou multirresistência^{52,53}, podendo essa ser uma hipótese para a baixa associação encontrada entre os perfis de resistência e a presença do *Integron* de classe 1 neste estudo.

Detecção do gene de resistência *gyrA*

Dos 41 isolados de *Salmonella enterica* avaliados, o gene *gyrA* foi detectada em 32 isolados ou 78%. Estratificando os resultados da presença do *Integron* de classe 1 de acordo com os sorovares obtem-se os resultados mostrados abaixo na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequência de detecção do gene *gyrA* em *Salmonella enterica* isolados em pescado, segundo sorovares

Sorovares	Nº de isolados	Positivos para gene <i>gyrA</i>	% de positivos para gene <i>gyrA</i>
Heidelberg	18	15	83,3
Typhimurium	7	4	57,4
<i>Enterica</i> subsp <i>enterica</i> O:4,5	4	3	75
<i>Enterica</i> subsp <i>enterica</i> O:4,5:-:1,2	3	2	66,6
Gafsa	3	1	33,33
<i>Enterica</i> subsp <i>enterica</i> (rugosa)	2	2	100
Agona	1	1	100
<i>Enterica</i> subsp <i>enterica</i> O:6,7	1	1	100
Anatum	1	1	100
Tennessee	1	0	0

Dentre os isolados de *Salmonella enterica*, deste estudo, a presença do gene *gyrA* não ocorreu somente em *Salmonella enterica* sorovar Tennessee, que possuíam um único isolado, dentre as 41 amostras. Vale ressaltar que o isolados referente a esse sorovar, apresentou perfil de 100% de sensibilidade frente às seis bases testadas nesse estudo. (Tabela 4).

Os sorovares que apresentaram maior frequência de detecção do gene *gyrA*, são respectivamente *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar rugosa, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:6,7, *Salmonella enterica* sorovar Agona, *Salmonella enterica* sorovar Anatum, *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:4,5, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar O:4,5:-:1,2, *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *Salmonella enterica* sorovar Gafsa. (Tabela 4).

Estudos apontam que, isolados que possuem o gene *gyrA*, tendem a possuir perfil de resistência significativo a fluorquinolonas, como ácido nalidixíco e

ciprofloxacino⁵⁴, bases essas que tiveram seu desempenho testado frente aos isolados de *Salmonella enterica*.

Na tabela abaixo (Tabela 5), foi estabelecido paralelo entre o número de isolados que apresentaram perfis de resistência (resistência somados à resistência intermediária), com a detecção do gene *gyrA*.

Tabela 5 - Frequência de detecção do gene *gyrA* comparado à resistência a fluorquinolonas

Antimicrobianos	Resistência	Presença <i>gyrA</i>
Ácido Nalidixico	26(63,4%)	18(69,2%)
Ciprofloxacino	26(63,3%)	17(65,3%)

Quando avaliamos a presença do gene *gyrA* em *Salmonella enterica* que demonstraram perfil de resistência e/ou resistência intermediária para ácido nalidíxico, constatou-se a presença do gene em 18 isolados (69,2%) e para os que apresentaram resistência ao ciprofloxacino o gene esteve presente em 17 dos isolados (65,3%).

Em estudo realizado por Neupane et al.⁵⁵, foi determinado que a susceptibilidade reduzida ao ciprofloxacino de isolados de *Salmonella enterica* sorovar Paratyphi A, foi associada a presença de mutação no gene *gyrA*, assim como no estudo conduzido por Chiou et al.⁵⁶, que concluíram que a presença do gene avaliado, aumenta a capacidade de resistência dos isolados frente à ácido nalidíxico e ciprofloxacino por resultar em aumento de atividade de bomba de efluxo.

Ao avaliar a etiologia da progressão de perfil de resistência de *Salmonella* sp. frente ao ácido nalidixico, em um intervalo de nove anos, Stevenson et al.⁵⁷, atribuíram como causa, o aumento da circulação nos Estados Unidos, de isolados que carregavam genes *gyrA*.

Um dos principais fatores apontados por Shang et al.⁵⁸, para os crescentes percentuais de isolados de *Salmonella enterica* resistentes, como no seu estudo onde a prevalência de isolados resistentes ao ácido nalidixico de 97,6%, é o manejo incorreto do uso de antimicrobianos no ambiente de criação dos animais, que propicia por pressão seletiva a permanência da circulação de isolados com genes mutagênicos.

Ao compararmos as altas resistências encontradas neste estudo dos isolados frente ao ácido nalidíxico e ciprofloxacino, e presença do gene *gyrA* nos isolados com esse perfil, percebe-se similaridade com grande parte dos estudos publicados, que de modo geral relacionam diretamente a presença de *gyrA* com a diminuição da susceptibilidade à essas bases.

CONCLUSÃO

- *Salmonella enterica* apresentou considerável resistência aos antimicrobianos avaliados, principalmente quando considerados também os perfis de resistência intermediária, tendo o ácido nalidíxico apresentado maior número de isolados resistentes.
- Foi observado a presença de isolados multirresistentes a antimicrobianos.
- A região variável do *Integron* de classe 1 foi detectada nos sorovares de *Salmonella enterica* analisados em DNA plasmidial.
- Houve associação entre a presença do *Integron* de classe 1 e a resistência antimicrobiana apenas para a ceftriaxona. Para as outras bases testadas, não houve associação comprovada, assim como para a presença de isolados multirresistentes.
- O gene *gyrA* foi detectado nos sorovares de *Salmonella enterica*, principalmente nos isolados que apresentaram perfis de resistência para ácido nalidíxico e ceftriaxona.

REFERÊNCIAS

1. Kumar R, Datta TK, Lalitha VK. *Salmonella* grows vigorously on seafood and expresses its virulence and stress genes at different temperature exposures. BMC Microbiol. [online] 2015;15(254):1-10
2. CDC - Centers for Disease Control and Prevention: Foodborne Outbreak Database 2017 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (US).
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil [online] Brasília: Ministério da Saúde, 2018.
4. Lai J, Wu C, Wu C, Qi J, Whang Y, Whang H, Liu W, Shen J. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. Int. J. Food Microbiol. [online] 2014; 180: 30-38.
5. Magiorakos APA, Srinivasan RB, Carey Y, Carmeli ME, Falagas CG, Giske S, Harbarth JF, Hindler G, Kahlmeter B, Olsson-Liljequist DL, Paterson LB, Rice J, Stelling MJ, Struelens A, Vatopoulos JT, Weber DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin. Microbiol. Infect. [online] 2012; 18: 268-281.
6. Hur J, Jawale C, Lee J.H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. Food Res. Int. 2014; 45(2): 819-830.
7. Lopes GV, Michael GB, Cardoso M, Schwarz S. Antimicrobial resistance and Class 1 *Integron*-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. Vet. Microbiol. [online] 2016; 194: 84-92
8. Bispham J, Tripathi BN, Watson PR, Wallis TS. *Salmonella* pathogenicity island 2 influences both systemic salmonellosis and *Salmonella*-induced enteritis in calves. Infect. Immun. [online]. 2001; 69(1): 367-377.
9. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? Clin. Microbiol. Rev. [online] 2013; 26(2): 185-330.
10. Glenn LM, Lindsey RL, Folster JP, Pecic G, Boerlin P, Gilmour MW, Harbottle H, Zhao S, McDermott PF, Fedorka-Cray PJ, Frye JG. Antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolated from animals, retail meats, and humans in the United States and Canada. Microb Drug Resist [online] 2013; 19(3): 175-184.
11. Firoozeh F, Zahraei-Salehi T, Shahcheraghi F, Karimi V, Aslani MM. Characterization of class I *Integrans* among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis

isolated from humans and poultry. FEMS Immunol Med Microbiol [online] 2012; 64(2): 237-243.

12. Arguello H, Guerra B, Rodríguez I, Rubio P, Carjaval A. Characterization of Antimicrobial Resistance Determinants and Class 1 and Class 2 Integrons in *Salmonella enterica* spp., Multidrug-Resistant Isolates from Pigs. Gen. 2018;256(9): 1-13.

13. Le'vesque C, Piche L, Larose C, Roy P. PCR Mapping of *Integrons* Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. Antimicrob Agents Chemother [online] 1995; 39(1): 185-191.

14. Sant'ana A. Introduction to the Special Issue: Salmonella in foods: evolution, strategies and challenges. Food Reserch Int. [online] 2012; 45: 401-454.

15. Vasemagui A. Effect of Environmental Factors and an Emerging Parasitic Disease on Gut Microbiome of Wild Salmonid Fish. of wild salmonid fish.MSphere. 2017; 2(6): 1-15.

16. Fernandes DVGS, Castro VS, Neto AC, Figueiredo EES. *Salmonella* spp. in the fish production chain: a review. Cienc Rur. 2018; 48(8): 1-11.

17. Li KG. *Salmonella Weltevreden* in integrated and non-integrated tilapia aquaculture systems in Guangdong, China. Food Microbiol. 2017; 65: 19-24.

18. Amagliano GBG, Schiavano, GF. Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. Food Resear Internat. [online] 2012; 45(2):780-788.

19. Duarte DAM. Ocorrência de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus* coagulase positiva em pescado no Nordeste, Brasil. Arq Inst Biol. [online] 2010; 77:711-713.

20. Carrasco E, Rueda AM, Gimeno RMG. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. Food Resch Internat. 2012; 45:545-556.

21. Whang H. Comparison of microbial transfer rates from *Salmonella* spp. biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat. Food Control. 2015; 50:574-580.

22. Santos RRD. Ocorrência, tipagem molecular e capacidade de colonização de amostras de *Salmonella enterica* em peixes nativos. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2015.

23. Rahime E, Shakerian A, Falavarjani AG. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fish, shrimp, lobster, and crab in Iran. Comp Clin Pathol. 2013; 22:59-62.

24. Liuson, E. Pesquisa de coliformes totais, fecais e *Salmonella* spp em tilápias de pesqueiros da região metropolitana de São Paulo. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Área do Conhecimento Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. 2013.

25. Martins CN. Parâmetros de qualidade e valoração de pescada da espécie *Macrodon ancylodon*: características sensoriais, físico-químicas, microbiológicas, parasitológicas e contaminantes inorgânicos. São Paulo, 2011. 196 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2011.
26. Damasceno A. Qualidade (sensorial, microbiológica, físico-química e parasitológica) de salmão (*Salmo salar*, Linnaeus, 1778) resfriado, comercializado em Belo Horizonte, MG. Belo Horizonte, 2009. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
27. Soares VM, Pereira JG.; Izidoro TB.; Martins OA.; Pinto, JPAN.; Biondi, GF. Qualidade microbiológica de files de peixe congelados distribuídos na cidade de Botucatu – SP. UNOPAR Científica. 2011;12(2): 85-88.
28. Broughton EI, Walker DG. Prevalence of antibiotic-resistant *Salmonella* in fish in Guangdong, China. *Foodb pathog and disease*,. [online]. 2009; 6(4): 519-521.
29. Setti IA, Silva MC, Raufi IA. Characteristics and dynamics of *Salmonella* contamination along the coast of Agadir, Morocco. *Apl Envir Microbiol*. [online] 2009; 75: 7700-7709.
30. Elhadi N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern Province of Saudi Arabia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(3): 234-238.
31. Hakanen A, Kotilainen P, Jalava J, Siitonen A, Huovinem P. Detection of Decreased Fluoroquinolone Susceptibility in *Salmonellas* and Validation of Nalidixic Acid Screening. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(11): 3572–3577.
32. Folster JP, Tolar B, Pecic G, Sheehan D, Rickert R, Hisel K, Zhao S, Ferdoka-Cray PJ, McDermott P, Whichard JM. Characterization of blaCMY Plasmids and Their Possible Role in Source Attribution of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Infection. *Foodborne Pathog Dis*. 2014; 11(4): 301–306.
33. McCollister B, Kotter CV, Frank DN, Washburn T, Jobling MG. Whole-Genome Sequencing Identifies In Vivo Acquisition of a blaCTX-M-27-Carrying IncFII Transmissible Plasmid as the Cause of Ceftriaxone Treatment Failure for an Invasive *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection. *PloS One*. [online] 2017: 23(2); 1-16.
34. Zang WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critic Rev in Microbiol*. 2013; 39(1): 79–101.
35. Sivagami K, Vignesh VJ, Divyapriya RSG, Nambi IM. Antibiotic Usage, Resudues and Resistance Genes from Food Animals to humam and environment: Na Indian scenario. *J Environ Chem Eng*. [online] 2018: Accepted Manuscript..
36. Abakpaa GO, Umoha VJ, Ameha JB, Yakubua SE, Kwagab JKP, Kamaruzamanc S. Diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolated from fresh produce and environmental samples. *Env Nanotech, Monit Manag*. [online] 2015;3: 38-46.

37. Elhadi N. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. in raw retail frozen imported freshwater fish to Eastern Province of Saudi Arabia. *Asian Pac J Trop Biomed* 2014; 4(3): 234-238.
38. Almeida F, Seribelli AA, Medeiros MIC, Rodrigues DP, Varani NA, Luo Y, Allard MW, Falcão JP. Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing. *Plos One*. [online] 2018;6: 1-14.
39. Zhang AN, Li LG, Ma L, Gillings MR, Tiedje JM, Zhang T. Conserved phylogenetic distribution and limited antibiotic resistance of class 1 integrons revealed by assessing the bacterial genome and plasmid collection. *Microbiome*. [online] 2018; 13(8): 1-16.
40. Lai J, Wang Y, Shen J, Li R, Han J, Steven L. Foley SL, Wu C. Unique Class 1 *Integron* and Multiple Resistance Genes Co-located on IncHI2 Plasmid Is Associated with the Emerging Multidrug Resistance of *Salmonella* Indiana Isolated from Chicken in China. *Foodborne Pathog. Dis.* [online] 2013; 10 (7): 581-588
41. Arguello H, Guerra B, Rodrigues I, Rubio P, Carvajal A. Characterization of Antimicrobial Resistance Determinants and Class 1 and Class 2 Integrons in *Salmonella enterica* spp., Multidrug-Resistant Isolates from Pigs. *Genes*. [online] 2018; 9 (5): 256-269.
42. Ahmed HA, El-Hofy FI, Shafik SM, Abdelrahman MA, Elsaid GA. Characterization of Virulence-Associated Genes, Antimicrobial Resistance Genes, and Class 1 *Integrons* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Isolates from Chicken Meat and Humans in Egypt. *Foodborne Pathog. Dis.* [online] 2016; 13 (6): 281-287
43. Shu YM, Tang CY, Lin H, Chen YH, Chen YL, Su YH, Chen DS, Lin JH, Chang CC. Comparative study of class 1 *Integron*, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various *Salmonella* serovars from humans and animals. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* [online] 2013; 36(1): 9-16.
44. Lindstedt BA, Heir E, Nygard I, Kapperud G. Characterization of class I integrons in clinical strains of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from Norwegian hospitals. *J Med Microbiol.* 2003; 52:141-149.
45. Ribeiro VB, Lincopan N, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. *Braz J Microbiol.* [online]. 2011; 42(2): 685-692.
46. Oliveira AP. Suscetibilidade a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella enterica* de origem avícola. Tese [online]. 2016. 76p.
47. Yang D, Xuerui B, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, Chen D, Bian H, Li Y, Yu G. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* [online]. 2015; 14: 45-51.

48. Michael R. Gillings. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol Mol Biol Rev.* [online]. 2014 Jun; 78(2): 257–277.
49. Lu Y, Zhao H, Sun J, Liu Y, Zhou X, Beier RC, Wu G, Hou X. Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovars Indiana and Enteritidis from Chickens in Eastern China. *Plos One.* [online]. 2014; 9(5): 1-15.
50. Eguale T, Marshall J, Molla B, Bhatiya A, Gebreyes WA, Engidawork E, Asrat D, Gunn JS. Association of multicellular behavior and drug resistance in *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and humans in Ethiopia. *J Appl Microbiol.* [online]. 2014 Oct; 117(4): 961–971.
51. Srisanga S, Angkititrakul S, Srirangam P, Phuong T. Le H, Chuanchuen TTVR. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance and virulence genes of *Salmonella enterica* isolated from pet dogs and cats. *J Vet Sci.* [online]. 2017; 18(3): 273–281.
52. Liljebjelke KA, Hofacre CL, White DG, Ayers S, Lee MD, Maurer JJ. Diversity of Antimicrobial Resistance Phenotypes in *Salmonella* Isolated from Commercial Poultry Farms. *Front Vet Sci.* [online]. 2017; 4: 96-101.
53. Crump JA, Sjölund-Karlsson M, Gordon MA, Parry CM. Epidemiology, Clinical Presentation, Laboratory Diagnosis, Antimicrobial Resistance, and Antimicrobial Management of Invasive *Salmonella* Infections. *Clin Microbiol Rev.* [online]. 2015; 28(4): 901–937.
54. Tadesse G, Tessema TS, Beyene G, Aseffa A. Molecular epidemiology of fluoroquinolone resistant *Salmonella* in Africa: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* [online]. 2018; 13(2): 1-13.
55. Neupane GP, Kim DM, Kim SH, Lee BK. InVitro Synergism of Ciprofloxacin and Cefotaxime against Nalidixic Acid-Resistant *Salmonella enterica* Serotypes Paratyphi A and Paratyphi B. *Antimicrob Agents Chemother.* [online]. 2010; 54(9): 3696–3701.
56. Chiou CS, Lauderdale TL, Phung DC, Watanabe H, Kuo JC, Wang PJ, Liu YY, Liang SY, Chen PC. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Typhi Isolates from Bangladesh, Indonesia, Taiwan, and Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother.* . [online]. 2014; 58(11): 6501–6507.
57. Stevenson JE, Gay K, Barrett TJ, Medalla F, Chiller TM, Ângulo FJ. Increase in Nalidixic Acid Resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* Isolates in the United States from 1996 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother.* [online]. 2007 ; 51(1): 195–197.
58. Shang K, Wei B, Kang M. Distribution and dissemination of antimicrobial-resistant *Salmonella* in broiler farms with or without enrofloxacin use. *BMC Vet Res.* 2018; 14: 257-263.

CAPÍTULO 3

DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA EM *Salmonella* sp. ISOLADOS EM PESCADO

RESUMO

Neste estudo, propôs-se a avaliação da presença dos genes de virulência *invA*, *hilA*, *hilD*, *lpfA* e *spvR* nas cepas de *Salmonella enterica* isolados de pescado. O gene de virulência *invA* foi identificado em 100% (42/42), *spvR* em 71,42% (30/42), *hilD* em 23,8% (10/42) e *hilA* em 21,42% (9/42) e *lpfA* em 19,04% (8/42) dos sorovares identificados de *Salmonella enterica*. Foram identificados nove perfis de virulência (A, B, C, D, E, F, G, H e I). Ao todo, 50 % dos isolados se agruparam no perfil H, que possui como característica a ocorrência de dois genes de virulência simultaneamente.

Palavras-chave: *invA*, *hilA*, *hilD*, *lpfA*, *spvR*

DETECTION OF VIRULENCE GENES IN *Salmonella* sp. ISOLATED IN FISH

ABSTRACT

In this study, we evaluated the presence of virulence genes *invA*, *hilA*, *hilD*, *lpfA* and *spvR* in strains of *Salmonella enterica* isolated from fish. The *invA* virulence gene was identified in 100% (42/42), *spvR* in 71.42% (30/42), *hilD* in 23.8% (10/42) and *hilA* in 21.42% (9/42) and *lpfA* in 19.04% (8/42) of identified serovars of *Salmonella enterica*. Nine virulence profiles (A, B, C, D, E, F, G, H and I) were identified. In all, 50% of the isolates were grouped in the H profile, which has as a characteristic the occurrence of two virulence genes simultaneously.

Keywords: *invA*, *hilA*, *hilD*, *lpfA*, *spvR*

INTRODUÇÃO

Salmonella enterica é o microrganismo patogênico com maior incidência na etiologia de doenças veiculadas por alimentos (DVA's), já que quando comparada a outras DVA's, a salmonelose é a doença alimentar que afeta o maior número de pessoas, ocasionando em alguns casos agravos e sequelas, além de prejuízos diretos para economia e saúde pública ¹.

O fato de *Salmonella enterica*, estar envolvida diretamente à maioria dos casos de DVA's, deve-se principalmente à capacidade de adesão e invasão da célula hospedeira, assim como de sua capacidade de colonização, multiplicação e sobrevivência intracelular, mecanismos esses que estão associados ao genes de virulência presentes nesse microrganismo ^{2,3}.

Os genes de virulência podem estar localizados em diferentes elementos genéticos de *Salmonella* sp. como nas ilhas de patogenicidade (SPI), distribuídas no DNA cromossômico do microrganismo e ainda podem estar alocados em elementos genéticos móveis, como os plasmídeos ^{2,4,5}.

Das diversas ilhas de patogenicidade que podem estar dispostas no genoma bacteriano, destacam-se as ilhas de patogenicidade do tipo 1 (SPI-1) e ilha de patogenicidade tipo 2 (SPI-2), onde na SPI-1, estão os genes que expressam fatores que contribuem diretamente para a capacidade de invasiva da bactéria, como o sistema de secreção do tipo III (TTSS) e na SPI-2, os genes que permitem ao microrganismos a sobrevivência e multiplicação no ambiente intracelular da célula hospedeira ^{4,6,7}.

Na SPI-1, está localizado o *invA*, gene esse presente, em um *operon*, *invABCDEFGH* que atua na produção de proteínas, como o TTSS, envolvidas na etapa de invasão celular pelo microrganismo, elemento essencial para viabilidade da bactéria no organismo hospedeiro e desenvolvimento do processo patogênico decorrente da salmonelose. O gene *invA* está presente na região conservada do genoma de *Salmonella enterica*, tanto que sua presença é utilizada como elemento para identificação de gênero bacteriano ⁸.

Assim como o *invA*, os genes *hilA* e *hilD*, também localizados na SPI-1, contribuem para a capacidade invasiva de *Salmonella* sp., atuando na formação de TTSS e codificação de um regulador transcricional da família *Omp/ToxR* que ativamos genes de invasão, onde sua expressão são reguladas por condições ambientais como fase de crescimento, pH, tensão de oxigênio e osmolaridade ⁹.

Os plasmídeos, são moléculas de DNA de fita dupla circulares, que possuem replicação independente do DNA cromossômico, sendo esses elementos móveis, capazes de serem compartilhados entre microrganismos. Nos plasmídeos podem ser identificados genes ou *operons*, que são capazes de determinar fatores de virulência ao microrganismo, como o *operon spv* RABCD localizado em uma região altamente conservada do plasmídeo, que possui como principal gene o *spvR* que quando expresso garante a *Salmonella enterica* a capacidade de multiplicação na célula hospedeira e no endotélio intestinal, o que resulta diretamente em agravo no quadro de enterite causada pelo patógeno ^{10,11}.

Os fatores de virulência, que quando expressos permitem à *Salmonella enterica* invadir a célula hospedeira são de extrema importância para que o patógeno consiga se replicar e se disseminar pelo organismos hospedeiro, porém primariamente é necessário que esse microrganismos possua a capacidade de aderência à célula hospedeira, sendo essa capacidade atribuída à presença de adesinas, dentre elas as fímbrias, codificadas pelo *operon*

lpf ABCDE. A presença de fímbrias, permite que *Salmonella enterica* se adira às placas de Peyer no intestino delgado, onde estão localizadas as células M, alvos principais do microrganismos que facilitará sua disseminação sistêmica pelo organismo do hospedeiro^{12,13}.

O operon *lpf*ABCDE também são capazes de expressar fatores que permitem aos microrganismos a formação de biofilmes que age diretamente na manutenção da viabilidade do patógeno no ambiente e ainda como mecanismo indireto na resistência a antimicrobianos, já que confere proteção à bactéria, dificultando a ação das bases sobre o patógeno¹⁴.

Este trabalho teve o objetivo de identificar a presença dos genes *invA*, *hilA*, *hilD*, *lpfA* e *spvR*, obtendo assim perfil de virulência e potencial de patogenicidade dos isolados de *Salmonella enterica*, provenientes de pescado.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados

Os isolados foram obtidos de bacterioteca, mantida pelo CPA/EVZ/UFG. Os isolados, oriundos de pescado, foram isolados entres os anos de 2015 e 2017 e mantidos em ágar nutriente. Neste estudo foram avaliados 41 isolados, de origem de diferentes criadouros do Brasil.

Após seleção na bacterioteca, os isolados foram ressuspensos em caldos de enriquecimento seletivo e posteriormente isolados em placas, para obtenção de colônias puras que foram utilizadas como objeto desse estudo.

Serotipificação

Com intuito de caracterização antigênica, os isolados que apresentaram os resultados de testes convencionais característicos de *Salmonella* sp. foram semeados em Ágar Nutriente (Difco, USA) e enviados para o Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz–RJ.

Extração de DNA cromossomal

Os isolados criopreservados, foram resuspensos em caldo BHI (Difco, USA), onde foram encubados pelo prazo de 24 horas. Após incubação de todos os isolados, foram pipetadas alíquotas de 1,5 mL e submetidas à centrifugação 13000 rpm por 30s. Em seguida, foi realizada a extração do DNA cromossomal, utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega®, USA), seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante.

O DNA eluido foi armazenado em freezer a -80°C até o momento da realização da PCR em tempo real.

Extração de DNA plasmidial

Os isolados criopreservados, foram resuspensos em caldo *Luria-Bertani* (LB), onde foram encubados pelo prazo de 24 horas. Em seguida, foram pipetadas alíquotas de 1,5 mL e submetidas à centrifugação 13000 rpm por 30s, e descarte do sobrenadante. O sedimento celular foi ressuspensado em 600 µL de água deionizada.

Após a ressuspensão do sedimento celular, foi realizada a extração de DNA plasmidial utilizando o kit *PureYield™ Plasmid Miniprep system* (Promega®, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Após o processo de extração, foi obtido 30 uL de filtrado, sendo então armazenado em freezer a -20°C, até o momento da realização da PCR em tempo real.

Quantificação do DNA extraído

As concentrações dos DNAs cromossomais e plasmidiais extraídos foram verificadas em nanofotômetro (Nanophotometer® P300, Implen GmbH®, Munique, Alemanha), com leitura nos comprimentos de onda 260 e 280 nm.

Detecção de genes de virulência

As detecções dos genes *invA*, *hilA*, *hilD*, *lpfA* e *spvR* foram realizada por PCR em tempo real. Os iniciadores utilizados estão dispostos no Quadro 1.

Quadro 1 - Sequência de iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real

Gene	Iniciador	Referência	Localização do gene
<i>invA</i>	Senso - 5' GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGCAA 3'	Rahn et al. ¹⁶	Cromossomo
	Antissenso - 5' TCATCGCACCGTCAAAGGAAC 3'		
<i>hilA</i>	Senso - 5' CATGGCTGGTCAGTTGGAG3'	Yang et al. ¹⁷	Cromossomo
	Antissenso - 5' CGTAATTCATCGCCTAAAGC3'		
<i>hilD</i>	Senso - 5' ACTGCAGATACCGACGCAAC3'	Yang et al. ¹⁷	Cromossomo
	Antissenso - 5' CTTCTGGCAGGAAAGTCAGG3'		
<i>lpfA</i>	Senso - 5' AGCCAACGTAGTGGTGGATT 3'	Oliveira ¹⁸	Cromossomo
	Antissenso - 5' AGACGATGCGACACTGGTTT 3'		
<i>spvR</i>	Senso - 5' GCCGTGAATACAGGTGTTGC 3'	Oliveira ¹⁸	Plasmídeo
	Antissenso - 5' TCTGTCCGGCTCTGGGATTA 3'		

Para realização do PCR em tempo real utilizou-se o volume de reação de 20µL, contendo 12.5µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA), 0,2 µL para cada primer (1µM concentração), 5,1µL de água sem nuclease e 2µL de DNA da amostra. A reação realizada no equipamento Step One Plus – Real Time PCR System (Applied Biosystem, USA). Como controle positivo foi utilizado DNA de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium (ATCC 14028), e como controle negativo foi adicionado água no lugar de DNA, tendo sido incluídos em cada reação. Para amplificação do DNA no termociclador foram utilizadas quatro etapas: Dois minutos de aquecimento inicial para ativação enzimática a 95°C, 30 segundos para desnaturação a 95°C, 30 segundos para anelamento a 60°C e um

minuto para extensão a 74°C, as etapas de desnaturação, anelamento e extensão foram repetidas em um total de 40 ciclos e 15 segundos a 95°C, um minuto a 60°C, 15 segundos a 95°C para dissociação, obtendo-se a curva de melt da reação de cada amostra.

Perfis de virulência

Os resultados da detecção dos genes de virulência foram analisados, e os perfis de virulência foram construídos por meio de análise combinatória usando "1" para presença e "0" para ausência de genes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *Salmonella enterica* avaliados, resultaram em nove perfis de virulência. O perfil H contém a maior parte dos isolados 51,2% (21/41), seguido do perfil I com 19,5% (8/41). Os sorovares que apresentam maior variabilidade de perfis virulentos, são *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg, com sete perfis de virulência, *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium e *Salmonella enterica* sorovar Gafsa com três perfis de virulência, cada um (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição de genes de *Salmonella enterica* em perfis de virulência e sua frequência de acordo com os sorovares.

Perfil de virulência	Genes <i>invA</i> , <i>hilA</i> , <i>hil D</i> <i>lpfA</i> , <i>spvR</i>	Sorovares (n° de amostras)										Total	
		Heidelberg (19)	Typhimurium (6)	O:4,5 (2)	Gafsa (3)	O:4,5:-:1,2 (5)	Anatum (1)	Rugosa (2)	Tennessee (1)	O:6,7 (1)	Agona (1)		
A	11111	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3 (7,31%)
B	11110	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	3 (7,31%)
C	11101	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,43%)
D	11001	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (4,87%)
E	10111	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,43%)
F	10110	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1 (2,43%)
G	10101	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (2,43%)
H	10001	9	3	0	1	4	0	2	1	0	1	1	21 (51,2%)
I	10000	4	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	8 (19,5%)

Perfil de virulência: 1 para positivo e 0 para negativo

A distribuição dos genes de virulência entre os sorovares de *Salmonella enterica* está disposta na Tabela 2.

Tabela 2 – Frequência de genes de virulência em *Salmonella* sp. de acordo com os sorovares.

Sorovares (n)	Genes				
	<i>invA</i> (N/n)	<i>hilA</i> (N/n)	<i>hilD</i> (N/n)	<i>lpfA</i> (N/n)	<i>spvR</i> (N/n)
Agona (1)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
Anatum (1)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
Tennessee (1)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)
O:6,7 (1)	1/1 (100%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)
Rugosa(2)	2/2 (100%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	0/2 (0%)	2/2 (100%)
O:4,5 (4)	4/4 (100%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)	1/4 (25%)	4/4 (100%)
O:4,5:-:1,2(3)	3/3 (100%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)	2/3 (66%)
Gafsa(3)	3/3 (100%)	2/3 (66%)	2/3 (66%)	2/3 (66%)	2/3 (66%)
Typhimurium(6)	6/6 (100%)	1/6 (16,6%)	1/6 (16,6%)	1/6 (16,6%)	3/6 (50%)
Heidelberg(19)	19/19 (100%)	5/19 (26,31%)	5/19 (26,31%)	3/19 (15,78%)	14/19(73,68%)
Total	41 (100%)	9 (21,9%)	10 (24,4%)	8 (19,5%)	29 (70,7%)

O gene com maior nível de detecção foi o gene *invA*, sendo detectado em todos os sorovares, seguido pelo *spvR*, *hilD*, *hilA* e *lpfA* (Tabela 2).

O gene *invA*, por se encontrar em região conservada da *SPI-1*, é utilizado em técnicas moleculares, como gene alvo para identificação de *Salmonella enterica* por estar presente em praticamente todos os sorovares^{19,20}. O que corrobora com o achado de 100% de detecção do gene *invA*, observado nesse estudo.

De forma semelhante aos resultados obtidos, estudo realizado por Pal et al.²¹, Siala et al²², Kasturi & Drgon²³, obtiveram presença do gene *invA* em 100% dos isolados de *Salmonella* sp, de origem de diferentes matrizes alimentares. Em pesquisas realizadas no Brasil, os índices de detecção se mostram similares aos trabalhos citados anteriormente, como no estudo de Rowlands et al²⁴, que propuseram avaliar perfis de virulência e resistência de *Salmonella* sp. de origem alimentar e de Oliveira¹⁸, que avaliou os mesmos perfis em isolados de *Salmonella enterica* de origem avícola.

O gene *invA* localiza-se na ilha de patogenicidade de *Salmonella* 1 (*SPI 1*)⁶ e participa da expressão do sistema de secreção do tipo III, que atua diretamente na internalização do patógeno em células não fagocíticas²⁵. Isolados que apresentam mutações neste gene, que impedem a expressão do sistema de secreção do tipo III (T3SS), possuem menor capacidade de invasividade e menor potencial de virulência de²⁶.

O gene *hilA* e *hilC*, são encontrados na *SPI 1* e desempenham papel importante na determinação da capacidade de invasividade de *Salmonella* sp. frente aos enterócitos²⁷, onde o

gene *hilA* atua como um regulador transcricional do T3SS, atividados por componentes exógenos, osmolaridade, oxigênio, pH, estado de crescimento, ácidos graxos de cadeia curta, biliar e temperatura, onde sua regulação positiva leva ao aumento da expressão de todos os outros genes contidos no SPI-1²⁸. O gene *hilC* também atua como um regulador transcricional do T3SS e regula a expressão do gene *hilA*, por meio da captação de estímulos exógenos²⁹.

Neste estudo a detecção dos genes *hilA* e *hilC*, foram respectivamente de 21,9% e 24,4%, grau de detecção similar entre eles que pode ser explicado pelo fato da presença do gene *hilC* atuar como um regulador do gene *hilA*. O índice relativamente baixo de detecção nos isolados também foi encontrado no estudo de Baxter & Jones²⁸, que encontraram como possível causa a presença de um elemento de membrana, *phoPQ* que quando expresso induz negativamente a expressão de *hilA*.

Outra justificativa, para a baixa detecção de genes *hilA* e *hilC* em isolados de *Salmonella* sp, foi demonstrada por Golubeva et al.³⁰, que concluíram que a perda de elemento enzimático, FadD, que possibilitaria a degradação de ácidos graxos de cadeia longa, afetam diretamente a expressão de *hilA* e *hilC*, já que a persistência de de ácidos graxos de cadeia longa reprimem a expressão dos genes.

Ao contrário dos resultados deste estudo, Cooper et al³¹, Jiang et al³² e Elhadad et al.³³, encontraram em suas avaliações índices consideráveis de expressão dos genes *hilA* e *hilC*, principalmente quando submetidos a ambientes com reguladores positivos para sua expressão.

O gene *lpfA* foi o de menor ocorrência entre os genes avaliados 19,5%, índice de detecção contrário à maioria dos trabalhos como o de Oliveira¹⁸, que ao avaliar a presença do gene em isolados de *Salmonella enterica* de matriz avícola, obteve detecção de 86,5%. Outros estudos, como os de Nickerson et al.³⁴, Borsoi et al³⁵ e Borges et al³⁶, obtiveram índices ainda maiores de presença do gene nos isolados, alcançando índices próximos de presença do gene em 100% dos isolados avaliados.

A presença do operon *lpf*, é um elemento genético de influência direta na capacidade do microrganismo em se aderir às células M, presentes na placa de Peyer do íleo³⁷. Sem a expressão desses genes, o microrganismos reduz à índices consideráveis sua capacidade invasiva, já que sem a expressão de fímbrias o processo de aderência do patógeno aos enterócitos ocorrerá em menor magnitude³⁸.

O gene *spvR*, neste estudo esteve presente em 70, 7% dos isolados avaliados, distribuído na maioria dos sorovares identificados, não estando presente apenas nos sorovares

Anatum e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,7). O gene *spvR* é constituinte do operon *spvRABCD* e nesse possui ação reguladora, e sua expressão contribui positivamente para a virulência do patógeno, potencializando sua capacidade de disseminação sistêmica^{39,40}.

Resultados semelhantes, para o gene *spvR* foram determinados por Makwana et al⁴¹, Chaudhary et al⁴² e Lopes et al.⁴³, que por meio de suas pesquisas obtiveram altas taxas de detecção no isolados de *Salmonella* sp. avaliados.

A presença de diferentes genes de virulência em um mesmo isolado, garantem a esse maior potencial de virulência, visto que um processo patogênico causado por *Salmonella* sp., é resultado da combinação entre a capacidade de aderência, invasividade e sobrevivência intracelular do patógeno no organismos hospedeiro. Nesse sentido, dentre os isolados avaliados neste estudo, o sorovar Heidelberg, foi o que apresentou a maior diversidade de perfis de virulência, sendo o único sorovar a conter isolados possuindo os cinco genes de virulência pesquisados.

CONCLUSÃO

- Os genes de virulência investigados estiveram presentes na maioria dos sorovares analisados.
- Houve diferenciação na presença dos genes de virulência para um mesmo sorovar e entre os sorovares, sendo identificados diferentes perfis de virulência.
- O conhecimento dos perfis de virulência dos isolados permite afirmar que os sorovares analisados, isolados de pescado, possuem capacidade de desencadear processo patogênico em humanos, sendo o consumo desses alimentos se não bem preparados, um fator de risco no que se refere à saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Jay MJ. Microbiologia de Alimentos. 6a ed. Porto Alegre: Artmed, 2005:711p.
2. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinic. Microbiol. Rev.* [online] 2013; 26(2): 185-330.
3. Tekale AA, Savalia CV, Kshirsagar DP, Brahmabhatt MN, Chatur YA. Detection and Virulence Gene Characterization of Salmonella Isolates from Fish by Conventional and Molecular Methods. *J. Vet. Pub. Hlth.* [online] 2013; 13(1): 43-46.
4. Amavisit D, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. Variation between Pathogenic Serovars within Salmonella Pathogenicity Islands. *J. Bacteriol.* [online] 2003; 185(12): 3624-3635.
5. Folster JP, Grass JE, Bicknese A, Taylor J, Friedman CR, Wichard M. Characterization of Resistance Genes and Plasmids from Outbreaks and Illness Clusters Caused by Salmonella Resistant to Ceftriaxone in the United States, 2011–2012. *Microb. Drug. Resist.* [online] 2017; 23(2): 188-193.
6. Temme K, Salis H, Tullman-ercek D, Levskaya A, Soon-ho H, Voigt CA. Induction and Relaxation Dynamics of the Regulatory Network Controlling the Type III Secretion System Encoded with in *Salmonella* Pathogenicity Island 1. *J Mol Biol* [online]. 2008; 377(1): 47–61.
7. Waterman SR, Holden DW. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell. Microbiol.* [online] 2003; 5 (8): 501-511.
8. Tung TY, Radu S, Mahyudin NA, Rukayadi Y, Zakaria Z, Mazlan N, Tan BH, Lee E, Yeah SL, Chin YZ, Tan CW, Kuan CH, Basri FD, Radzi CWJWM. Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of Salmonella Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. *Front.Microbiol* [online] 2018; 8; 1-8.
9. Lucas LR, Lee AC. Roles of *hilC* and *hilD* in Regulation of *hilA* Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Microbiol* [online]. 2001; 183 (9): 2733-2745.
10. Rotger R, Casadéus J. The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol* [online]. 2009; 2(3): 177-184.
11. Fabrega A, Vila J. Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clinic. Microbiol. Rev.* [online]. 2013; 26(2); 308-341.
12. Van Asten AJAM, Van Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among Salmonella spp. *Fems Immunol Med Microbiol* [online]. 2005; 44(3):251-259.
13. Elemfarej OI, Thong KL. Comparative Virulotyping of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*. *Indian J. Microbiol* [online]. 2013; 53(4): 410-417.

14. Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. Biofilm form abilities *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. BMC. Vet. Reschr. [online]. 2009; 5(20): 1-6.
15. Brasil, Instrução Normativa N°9 de 27 de junho de 2003. Dispõe sobre Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, com seus respectivos capítulos e anexos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados no Sistema de Laboratório Animal do Departamento de Defesa Animal. Diário Oficial da União, Brasília (26 ago 2003).
16. Rahn K, De Grandis SA, Clarke RC, McEwen SA, Galin JE, Ginocchio C, Curtiss 111 R, Gyles CL. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes [online] 1992; 6 (4): 271-279.
17. Yang X, Brisbin J, Yu H, Wang Q, Yin F, Zhang Y, Sabour P, Sharif S, Gong J. Selected Lactic Acid-Producing Bacterial Isolates with the Capacity to Reduce *Salmonella* Translocation and Virulence Gene Expression in Chickens. Plos One. 2014;9(4):1-10.
18. Oliveira AP. Suscetibilidade a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella enterica* de origem avícola. Tese [online]. 2016. 76p.
19. Guo J, Chan EWC, Chen S, Zeng Z. Development of a Novel Quantum Dots and Graphene Oxide Based FRET Assay for Rapid Detection of *invA* Gene of *Salmonella*. Front Microbiol. [online]. 2017; 8: 1-8.
20. Yang Q, Domesle KJ, Ge B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. Foodborne Pathog Dis. [online]. 2018; 15(6): 309–331.
21. Pal S, Dey S, Batabyal K, Banerjee A, Joardar SN, Samanta I, Isore DP. Characterization of *Salmonella Gallinarum* isolates from backyard poultry by polymerase chain reaction detection of invasion (*invA*) and *Salmonella* plasmid virulence (*spvC*) genes. Vet World. [online] 2017; 10(7): 814–817.
22. Siala M, Barbana A, Samoui S, Hachicha S, Marouane C, Kammoun S, Gdoura R, Akroun FM. Screening and Detecting *Salmonella* in Different Food Matrices in Southern Tunisia Using a Combined Enrichment/Real-Time PCR Method: Correlation with Conventional Culture Method. Front Microbiol.[online] 2017; 8: 2416-2428.
23. Kasturi KN, Drgon T. Real-Time PCR Method for Detection of *Salmonella* spp. in Environmental Samples. Appl Environ Microbiol. [online] 2017 ; 83(14):1-15.
24. Rowlands REG, Ristori CA, Ikuno AA, Barbosa ML, Jakabi M, Franco BDGM. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. [online] 2014; 56(6): 461–467.
25. Laughlin RC, Knodler LA, Barhoumi R, Payne HR, Wu J, Gomez G, Pugh R, Lawhon SD, Bäumlér AJ, Steele-Mortimer O, Adams LG. Spatial Segregation of Virulence Gene Expression during Acute Enteric Infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. MBio [online] 2014; 5 (1): 1-11

26. Galan JE, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and Functional Characterization of the Salmonella Invasion Gene *invA*: Homology of *InvA* to Members of a New Protein Family. *J Bacteriol.* [online] 2002; 174 (13): 4338-4349.
27. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. *Clin Microbiol Ver.* [online] 1999; 12:405–428.
28. Baxter MA, Jones BD. Two-Component Regulators Control *hilA* Expression by Controlling *fimZ* and *hilE* Expression within Salmonella enterica Serovar Typhimurium. *Infect Immun.* [online] 2015 Mar; 83(3): 978–985.
29. Ellermeier CD, Ellermeier JR, Slauch JM. HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator *hilA* in Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Mol Microbiol.* [online] 2005;57:691–705.
30. Golubeva YA, Ellermeier JR, Chubiz JEC, Slauch JM. Intestinal Long-Chain Fatty Acids Act as a Direct Signal To Modulate Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System. *mBio.* [online] 2016; 7(1):1-18.
31. Cooper KG, Chong A, Starr T, Finn CE, Mortimmer OS. Predictable, Tunable Protein Production in Salmonella for Studying Host-Pathogen Interactions. *Front Cell Infect Microbiol.*[online] 2017; 7: 475-485.
32. Jiang L, Feng L, Yang B, Zhang W, Wang P, Jiang X, Wang L. Signal transduction pathway mediated by the novel regulator *LoiA* for low oxygen tension induced Salmonella Typhimurium invasion. *PLoS Pathog.* 2017 Jun; 13(6): 1-14.
33. Elhadad D, Desai P, Grassl GA, McClelland M, Rahav G, Gal-Mor O. Differences in Host Cell Invasion and Salmonella Pathogenicity Island 1 Expression between *Salmonella enterica* Serovar Paratyphi A and Nontyphoidal S. Typhimurium. *Infect Immun.* [online] 2016; 84(4): 1150–1165.
34. Nickerson KP, Senger S, Zhang Y, Lima R, Patel S, Ingano L, Flavahan WA, Kumar DKV, Fraser CM, Faherty CS, Sztein MB, Fiorentino M, Fasano A. Salmonella Typhi Colonization Provokes Extensive Transcriptional Changes Aimed at Evading Host Mucosal Immune Defense During Early Infection of Human Intestinal Tissue. *EBioMedicine.* [online] 2018; 31: 92–109.
35. Borsoi A, Santin E, Santos LR, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP. Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulsed field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poultry Science Association* [online] 2009; 88 (4): 750-758.
36. Borges KA , Furian TQ, Borsoi A, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. Detection of virulence-associated genes in Salmonella Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. *Pesq. Vet. Bras* [online] 2013; 33(12): 1416-1422.
37. Wagner C, Hensel M. Adhesive mechanisms of Salmonella enterica. *Adv. Exp. Med. Biol.* [online]. 2011; 715: 17-34.

38. Gonzales AM, Wilde S, Roland KL. New Insights into the Roles of Long Polar Fimbriae and Stg Fimbriae in Salmonella Interactions with Enterocytes and M Cells. *Infect. Immun.* [online]. 2017; 85(9): 1-12.
39. Matsui H, Bacot CM, Garlington WA, Doyle TJ, Roberts S, Gulig PA. Virulence Plasmid-Borne spvB and spvC Genes Can Replace the 90-Kilobase Plasmid in Conferring Virulence to Salmonella enterica Serovar Typhimurium in Subcutaneously Inoculated Mice. *J Bacteriol* [online]. 2001; 183(15): 4652-4658.
40. Heithoff D.M, Shimp W.R, Lau P.W, Badie G, Enioutina E.Y, Daynes K, Barbara R.A, Byrne A, House J, Mahan M.J. Human *Salmonella* clinical isolates distinct from those of animal origin. *Appl. Environ. Microbiol.* [online]. 2008; 74(6) :1757–1766.
41. Makwana PP, Nayak JB, Brahmhatt MN, Chaudhary JH. Detection of Salmonella spp. from chevon, mutton and its environment in retail meat shops in Anand city (Gujarat), India. *Vet World.* 2015; 8(3): 388–392.
42. Chaudhary JH, Nayak JB, Brahmhatt MN, Makwana PP. Virulence genes detection of *Salmonella* serovars isolated from pork and slaughterhouse environment in Ahmedabad, Gujarat. *Vet World.* [online] 2015 Jan; 8(1): 121–124.
43. Lopes GV, Michael GB, Cardoso M, Schwarz S. Antimicrobial resistance and Class 1 *Integron*-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. *Vet. Microbiol.* [online] 2016; 194: 84-92.

CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Salmonella enterica se encontra presente e dispersa entre diferentes sorovares, em pescado, mesmo essa não sendo um microrganismos naturalmente encontrado nessa matriz alimentar, tendo assim risco inerente do consumo desse tipo de alimento, principalmente quando consumidos crus.

Dentre os sorovares capazes de causar doença em diferentes espécies, destacam-se *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium sendo descritos como importantes sorovares relacionados a doenças em humanos.

A diversidade dos perfis de virulência demonstrados, apontam sobre a alta capacidade de desenvolvimento de processos patogênicos, principalmente se os expostos comporem grupos populacionais de risco.

Salienta-se que além do potencial patogênico, os sorovares apresentaram resistência considerável frente às bases testadas, incluindo aquelas eleitas preferencialmente em casos de salmonelose. Outro fator a ser destacado é a observação de cepas multirresistentes, o que restringe e diminui a eficácia dos tratamentos, quando necessitam de intervenção medicamentosa.

A investigação dos genes de virulência se faz importante, pois denota informações sobre a patogenicidade dos sorovares isolados na matriz alimentar avaliada. E mesmo no caso de genes que foram relativamente detectados em menores níveis, a periculosidade no patógeno não pode ser descartada, uma vez que existem outros elementos genéticos não avaliados que podem resultar na expressão de fatores de virulência.

A confirmação da presença do *Integron* de Classe 1 e *gyrA* como fatores de resistência, bem como, a verificação de genes de resistência, é de extrema importância, uma vez que *Integrans* são elementos móveis, e que exercem papel fundamental na disseminação de resistência entre bactérias, incluindo entre espécies diferentes.

Por fim, os dados gerados por essa pesquisa, fornecem informações relevantes para os órgãos de saúde pública e vigilância epidemiológicas, fomentando dados principalmente quando se considera a matriz alimentar avaliada, o pescado, para adoção de medidas de controle de circulação do patógeno, desde o ambiente de cria e manejo do pescado até sua comercialização como produto processado, com intuito de prevenção da disseminação do patógeno, via veiculação alimentar e manutenção do status de saúde.