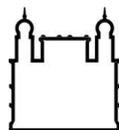




UFAM



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Leônidas e Maria Deane



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE PESQUISA LEÔNIDAS E MARIA DEANE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE SOCIEDADE E
ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
SALMONELAS ISOLADAS DE ÁREA RURAL E URBANA DE
MANAUS, AMAZONAS

ANDRÉIA SANTA RITA MACHADO

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE PESQUISA LEÔNIDAS E MARIA DEANE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE SOCIEDADE E
ENDEMIAS NA AMAZÔNIA

ANDRÉIA SANTA RITA MACHADO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
SALMONELAS ISOLADAS DE ÁREA RURAL E URBANA DE
MANAUS, AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas em parceria com Instituto Leônidas e Maria Deane - ILMD/Fiocruz Amazônia e Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, área de concentração Biologia dos agentes infecciosos e parasitários.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira

MANAUS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

M149c

Machado, Andréia Santa Rita.

de
Caracterização fenotípica e genotípica de salmonelas isoladas
de
área rural e urbana de Manaus, Amazonas. / Andréia Santa Rita
Machado. - Manaus: UFAM/FIOCRUZ/UFPA, 2013.

106f..

Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na
Amazônia) – UFAM/FIOCRUZ/UFPA, 2013.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira.

1. Salmonella sp. 2. Diarreia I. Título

CDU 576.8(811.3)(043.3)

ANDRÉIA SANTA RITA MACHADO

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
SALMONELAS ISOLADAS DE ÁREA RURAL E URBANA DE
MANAUS, AMAZONAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia da Universidade Federal do Amazonas em parceria com Instituto Leônidas e Maria Deane –ILMD/Fiocruz Amazônia e Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia, área de concentração Biologia dos agentes infecciosos e parasitários.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD

Profa. Dra. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Profa. Dra. Ormezinda Fernandes
Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD

Dedico este trabalho:

*Aos meus pais António Rodrigues
Machado e Maria do Livramento S.
Santa Rita que deram a vida e
ensinaram a mim e aos meus irmãos a
verdadeira educação.*

AGRADECIMENTO

Agradeço ao grandioso Deus por me dar forças e saúde para concluir mais esta jornada científica.

A minha família por tudo que representam em minha vida, amor e carinho eterno.

A Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira pela orientação, atenção necessária e conhecimento compartilhado no decorrer da pesquisa.

Ao Dr. Paulo Nogueira pela colaboração nas correções da dissertação e contribuição no desenvolvimento do trabalho.

Ao Dr. André Mariúba pelas correções no projeto e ajuda nas análises laboratoriais, muito obrigada.

Ao Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz pela estrutura física para o desenvolvimento dos trabalhos práticos.

A todos os profissionais e colaboradores do ILMD que direta e indiretamente contribuíram muito para o desenvolvimento deste estudo.

Ao corpo docente que provou estar qualificado para formação científica dos discentes.

As secretárias da SECA, Rosinete, Elen e Renata pela atenção, compreensão, apoio e orientação com documentação e deveres de cada aluno, muito obrigada!

A todos da equipe do grupo de pesquisa e colegas de trabalho (Edilene, Yury, Karen, Luciana, Leidiane, Maria Carolina, Alessandra, Fernanda, Maria, Geise, Késsia, Aline, Jeiscineide, Lorrane, Jeniffer, Diogo, Túllio, George, Victor) que sempre esteve presente no laboratório,

onde vivemos momentos de trabalho, momentos especiais com alegria e troca de conhecimentos. Não há espaço para demonstrar todo meu carinho.

Em especial a eterna amiga que ganhei nessa jornada, Ivanildes dos Santos pela ajuda nos trabalhos laboratoriais e longas conversas no fluxo laminar, inesquecíveis momentos.

A querida Paulinha, Paula Taquita, pela parceria na coleta em campo com muitas emoções, triagem das amostras, ajuda com o Pulsed Field, ajuda nas correções da dissertação, entre muitos outros pontos que esteve presente no decorrer deste estudo.

Agradeço a Xuxu, Carolinie Nobre, por todas as vezes que ficou até tarde da noite no laboratório, extraindo e purificando DNA comigo, fazendo placas de sequenciamento, quantificando, etc. Obrigada por todo o ensinamento sobre as técnicas moleculares e por atender a todos os pedidos de ajuda para esta dissertação.

Aos meus colegas e amigos da turma de mestrado, em especial a Mary Joyce, amiga, parceira, irmã que sempre me incentivou a estudar e pensar no meu futuro profissional. Obrigada pelo carinho minha grande amiga cabra da peste lá de Cruzetinha/RN.

Aos amigos George Villarouco e Maísa Porto pela ajuda com o sequenciamento das amostras, desde a graduação somos muito parceiros, obrigada my friends.

Aos servidores Antonio (estatístico de apoio no ILMD) e a Fernanda (Tecnologista em saúde pública) que ajudaram na análise dos resultados e elaboração de mapas e figuras.

Aos administradores e profissionais dos hospitais infantis que nos apoiaram e permitiram a realização da coleta de amostras e dados para a pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que financiou 24 meses de bolsa de estudo durante o mestrado.

"A dureza mental é essencial ao sucesso: é a unidade de propósitos, o caráter em ação, a capacidade de esquecer os pequenos problemas ou a pressão inerente a cada atividade. É a dureza mental, é a firmeza de objetivos que mantém uma pessoa acima de todos os entraves que aparecem em seu caminho" (Lombardi)

RESUMO

As salmonelas fazem parte da microbiota intestinal de muitos animais de sangue quente e frio. Podem causar gastroenterite leve ou até mesmo doenças invasivas graves, causadoras de 216 mil mortes/ano, e geralmente está associada a regiões de baixos níveis socioeconômicos e de saneamento básico. O objetivo deste estudo foi descrever as características genotípicas e fenotípicas de *Salmonella* isolada de área rural e urbana de Manaus/AM. Foram utilizadas amostras diarreicas coletadas de crianças de 0 a 10 anos de idade e amostras não diarreicas, coletadas de adultos, crianças, animais, além de amostras da água. Estas amostras foram isoladas em meio líquido Tetracionato de sódio, semeadas em meios sólidos seletivos para *Salmonella*. Em seguida foram selecionadas colônias com as características morfológicas para *Salmonella* e semeadas em provas bioquímicas para a caracterização fenotípica e identificação. Foi realizada a amplificação e o sequenciamento do gene 16S rRNA e análise da similaridade genética pela técnica de Pulsed Field para caracterização genotípica e identificação destas cepas. No total foram caracterizadas 22 salmonelas, sendo 3 (13,6%) *S. Paratyphi B*, 3 (13,6%) *S. Javiana*, 3 (13,6%) *S. enterica* subsp. *arizonae*, 3 (13,6%) *Salmonella enterica*, 3 (13,6%) *Salmonella* sp., 2 (9%) *S. Bareilly*, 2 (9%) *S. Typhimurium*, 1 (4,5%) *S. Agona*, 1 (4,5%) *S. Stanley* e 1 (4,5%) *S. Enteritidis*. Entre os 22 isolados, 100% foram sensíveis a ciprofloxacina e, 10 (46%) resistentes a Nitrofurantoína e 8 (36, 3%) a Sulfametaxazol + trimetropima. Estas cepas têm a capacidade para causar infecções invasivas, pois todas apresentaram fatores de virulência com capacidade de invasão, aderência e sobrevivência no interior da célula. A análise de similaridade genética formou perfis diferentes entre os isolados clínicos e isolados selvagens. Chama-se a atenção para realização contínua desse tipo de pesquisa, visando a melhoria no diagnóstico e diminuição da resistência aos antibióticos, além da criação de programas de controle e prevenção da doença.

Palavras-chave: Diarreia infantil, Pulsed Field, *Salmonella* sp., Virulência

ABSTRACT

Salmonella sp. lives in the intestinal tract of many warm and cold blooded animals. *Salmonella* can cause mild gastroenteritis and severe invasive diseases. Those are responsible for 216 thousands deaths /year, and are most commonly linked with areas of low socioeconomic status and sanitation. The aim of this study was to describe the genotypic and phenotypic characteristics of *Salmonella* isolated from countryside and urban areas of Manaus / AM. Samples were collected from children 0-10 years old with and without diarrhea in the urban area and in the countryside samples were collected from stools of adults, children, animals, and the water. These strains were isolated in liquid sodium Tetracionado, then, sown on solid media selective for *Salmonella*, reproduced in predetermined conditions for *Salmonella*. Colonies were then selected with morphological characteristics for *Salmonella* and sown in biochemical tests for phenotypic characterization and identification. We performed the amplification and sequencing of 16S rRNA and analyzed genetic similarity using the Pulsed Field technique for genotypic characterization and identification of these strains. In total, 22 *Salmonella* samples were characterized, 3 of (13.6%) *S. Paratyphi B*, 3 of (13.6%) *S. Javiana*, 3 of (13.6%) *S. enterica* subsp. *arizonae*, 3 of (13.6%) *Salmonella enterica*, 3 of (13.6%) *Salmonella* sp., 2 of (9%) *S. Bareilly*, 2 of (9%) *S. Typhimurium*, 1 of (4.5%) *S. Agona*, 1 of (4.5%) *S. Stanley* and 1 of (4.5%) *S. Enteritidis*. Among the 22 isolates, 100% were sensitive to Ciprofloxacin, 10 (46%) were resistant to Nitrofurantoin and 8 (36, 3%) were resistant to Sulfametaxazol + trimethopim. These strains have the ability to cause infections. All of them presented virulence factors with invasion, adhesion and survival capacity into the cell. The genetic similarity analysis generated different profiles among clinical isolates and wild isolates. We must call attention to this type of research and continue focusing on improving the diagnosis and decreasing resistance to antibiotics and ultimately the creation of programs for control and prevention of that disease.

Keywords: Childhood diarrhea, Pulsed Field, *Salmonella* sp., Virulence.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Distribuição dos sorovares de <i>Salmonella</i>	19
Quadro 1: Identificação bioquímica para <i>Salmonella</i>	21
Tabela 2: Genes usados na identificação da virulência de <i>Salmonella</i> e suas características ..	29
Tabela 3: Genes e <i>primers</i> para detecção de virulência de <i>S. enterica</i>	43
Tabela 4: Parâmetros de corrida eletroforética do PFGE na câmara CHEF DR-III.....	44
Tabela 5: Resultado da leitura do bioquímico das 22 cepas de <i>Salmonella</i> isoladas	47
Quadro 2: Isolados de <i>Salmonella</i> de amostras diarreicas e não diarreicas, de acordo com a positividade e negatividade das virulências e associação com os sintomas.....	59
Quadro 3: Dados epidemiológicos das crianças atendidas nos hospitais de coleta.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo de colonização do trato intestinal por <i>Salmonella</i>	28
Figura 2: Plano de assentamento da comunidade Rio Pardo/AM	36
Figura 3: Meios de cultura em placa para isolamento de <i>Salmonella</i> sp.....	38
Figura 4: Meios bioquímicos EPM, MILI, CS	39
Figura 5: Esquema da localização aproximada do anelamento dos iniciadores.....	42
Figura 6: Meios bioquímicos EPM, MILI, CS com cultura bacteriana	46
Figura 7: Gel da extração e amplificação do DNA das 22 cepas de salmonelas isoladas.....	48
Figura 8: Distribuição das salmonelas encontradas nas amostras clínicas em Manaus/AM....	50
Figura 9: Distribuição espacial dos isolados selvagens.....	52
Figura 10: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das salmonelas isoladas dos casos clínicos em Manaus	54
Figura 11: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados selvagens.....	55
Figura 12: Padrão da amplificação dos genes de virulência utilizados	56
Figura 13: Análise de correspondência simples das virulências identificadas nos 22 isolados de <i>Salmonella</i>	57
Figura 14: Relação dos genes de virulência com os sintomas das crianças com diarreia.....	60
Figura 15: Perfil de similaridade das cepas de <i>Salmonella</i> clínicas e selvagens por PFGE	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Classificação e nomenclatura do gênero <i>Salmonella</i>	18
3.2 Características morfológicas, isolamento e testes bioquímicos.....	19
3.3 Epidemiologia de salmonelose tifoide e não tifoide.....	22
3.4 Sensibilidade aos antimicrobianos.....	26
3.5 Patogenia e virulência de <i>S. enterica</i>	28
3.6 Métodos de tipificação de <i>S. enterica</i>	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Local de estudo: área urbana	34
4.2 Local de estudo: área rural.....	35
4.3 Análises laboratoriais para caracterização de <i>Salmonella</i>	37
4.3.1 Teste bioquímico	39
4.3.2 Caracterização do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos	39
4.3.3 Extração de DNA.....	40
4.3.4 Sequenciamento do gene 16s.....	41
4.3.5 Análises das sequências de DNA das salmonelas isoladas	42
4.3.6 Perfil dos genes de virulência presentes nas salmonelas	42
4.3.7 Eletrofoorese em gel de campo pulsado (PFGE)	43
4.4 Tratamento e análises dos dados	44
5 RESULTADOS.....	45
5.1 Origem das cepas de <i>Salmonella</i>	45
5.2 Identificação molecular	48
5.3 Distribuição epidemiológica das cepas isoladas.....	48
5.4 Perfil de resistência dos isolados aos antimicrobianos.....	53
5.5 Perfil dos genes de virulência das salmonelas isoladas.....	55
5.5.1 Sintomatologia das crianças com diarreia e as virulências dos isolados.....	59
5.6 Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).....	61

6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	76
8 REFERÊNCIAS	78
ANEXOS	89

1. Introdução

As salmonelas pertencem à família Enterobacteriaceae, compreende bacilos Gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e a maioria são produtores de gás a partir da glicose, exceto *Salmonella enterica* sorovar Typhi. Grande parte dos sorovares é móvel, movimentam-se por flagelos peritriquiais, com exceção de *Salmonella enterica* sorovar Pullorum e sorovar Gallinarum, que são imóveis. Bactérias deste gênero podem ser encontradas em diferentes habitats, alguns sorovares fazem parte da flora normal de muitos animais e outros são patogênicos aos seres humanos.

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças classifica o gênero *Salmonella* em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* acomete o homem e epidemiologicamente seus sorovares estão classificados em três diferentes grupos de acordo com o tipo de hospedeiro (CDC, 2005).

No primeiro grupo estão as salmonelas que não possuem hospedeiro eletivo, como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis, que infectam tanto humanos como animais. Nos outros dois grupos estão às salmonelas que acometem somente seres humanos, como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhi e aquelas que estão adaptadas somente aos animais, como aves (*S. enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum) e bovinos (*S. enterica* subsp. *enterica* ser. Abortusovis) (CDC, 2005; POPOFF; LE MINOR, 2001). *S. bongori* está mais associada a infecções em animais de sangue frio, mas pode causar também doenças em seres humanos e outros animais de sangue quente (GIAMMANCO *et al*, 2002).

Animais como cães, gatos, alguns répteis e aves podem ser portadores de *Salmonella*, representando grande risco de infecção para pessoas que estão em contato frequente com estes animais (CDC, 2013; POPOFF; LE MINOR, 2001). As crianças, os idosos e pessoas imunocomprometidas são os grupos mais propensos a ter salmonelose grave. Crianças com

menos de cinco anos de idade sofrem cerca de cinco vezes mais episódios do que todas as outras faixas etárias (CDC, 2013).

As salmonelas constituem uma das principais causas de doenças intestinais bacteriana no homem e nos animais, como as enterocolites e febres entéricas (febre tifoide e paratifoide), causada por *S. enterica* sorovar Thyphi e Pratyphi respectivamente. Estas febres se caracterizam como as mais graves doenças causadas por *S. enterica*, podendo apresentar-se de forma aguda, são transmissíveis, de caráter endêmico e acometem somente o homem. Os sintomas mais comuns incluem febre alta, diarreia e vômito, podendo causar danos respiratórios e hepáticos. A disseminação da infecção ocorre pelo contato interpessoal e através da água ou de alimentos contaminados com fezes humanas.

A Amazônia brasileira é responsável pela maioria das notificações de febre tifoide ocorridas no País. Febres entéricas e gastroenterites são doenças frequentes nessa região, apresentando índices elevados tanto em crianças como em adultos. Outro fator importante na disseminação dessa doença é a falta de saneamento básico, principalmente no Estado do Amazonas, onde populações ribeirinhas utilizam águas de rios, lagos, igarapés, cacimbas ou poços artesianos como única fonte de abastecimento doméstico, sendo que estas fontes encontram-se precariamente protegidas contra os dejetos humanos e de animais, tornando a água um veículo eficiente na transmissão e propagação de *Salmonella*, entre outros agentes patogênicos.

Pouco se conhece sobre a gravidade da virulência de *S. enterica*, sua prevalência em ambiente rural e urbano, resistência bacteriana, caracterização molecular e muitas outras abordagens que apresentam relevância para a comunidade científica e para a região norte do Brasil. Para isto, são necessários estudos que busquem informações, além da busca das principais origens de transmissão e epidemiologia da salmonelose. Dados como estes orientarão nas ações para controle das fontes de infecções, administração correta da

terapêutica e recuperação rápida dos pacientes, assim como tratamento de portadores que fazem o papel de disseminadores deste patógeno.

Neste trabalho estão descritas as características genotípicas e fenotípicas de *Salmonella enterica* isoladas da água, de fezes de pessoas e de animais de área rural e a prevalência dessa espécie em crianças de 0 a 10 anos de idade, atendidas em hospitais infantis da cidade de Manaus, Amazonas.

2. Objetivos

2.1 Geral: Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente as salmonelas entéricas isoladas de área rural e urbana da cidade de Manaus, Amazonas.

2.2 Específicos:

- Caracterizar bioquimicamente todos os sorovares de *Salmonella* isolados;
- Determinar o perfil de susceptibilidade dos sorovares aos antimicrobianos;
- Detectar os genes de virulência presentes nos isolados;
- Associar os genes de virulência com os isolados das duas áreas de estudo;
- Verificar a similaridade genética entre as amostras de *Salmonella* isoladas na área rural e na urbana e dentro de cada uma dessas áreas.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Classificação e nomenclatura do gênero *Salmonella*

Este gênero foi descoberto pelos veterinários Daniel Elmer Salmon e Theobald Smith em 1885, quando estudavam a peste suína. Inicialmente descreveram o bacilo desta doença como *Bacterium choleraesius*, que na época ficou conhecido como o segundo agente etiológico da peste suína (TORTORA *et al*, 2005). Alguns anos depois, Joseph Lignieres nomeou o gênero *Bacterium* como *Salmonella*, em homenagem ao seu descobridor, Daniel Salmon, sendo assim a espécie passou a ser conhecida como *Salmonella choleraesuis* (CRUMP, 2004).

De acordo com o sistema de classificação do Centro de Controle e Prevenção de Doenças – CDC (2005; 2007) e nomenclatura de POPOFF; LE MINOR (2001), são conhecidas duas espécies deste gênero, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* está dividida em seis subespécies – *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*, que por sua vez são classificadas em sorotipos ou sorovares (grupos de linhagens que compartilham antígenos de superfície reconhecidos por anticorpos específicos).

Os sorovares de *Salmonella enterica* subespécie *enterica* possuem uma nomenclatura diferenciada, onde a primeira letra fica em maiúsculo e não itálico, por exemplo, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Typhimurium, portanto quando descrevem determinada *Salmonella* costuma-se escrever somente o nome do gênero e do sorovar como, por exemplo, *Salmonella* Enteritidis. Para os sorovares das demais subespécies e para espécie *S. bongori* são utilizadas fórmulas antigênicas, de acordo com identificação de Kauffmann & White, que classifica os sorovares tendo como base seus antígenos somático (O), capsular (Vi) e flagelar (H) (BRENNER *et al*, 2000; CAMPOS, 1999; YAN *et al*, 2003; POPOFF; LE MINOR 2001; POPOFF *et al*, 2003).

O número de sorovares aumenta a cada ano e, com a identificação antigênica de Kauffmann e White já foi possível descrever mais de 2.500 sorovares. Destes, mais da metade pertencem à espécie *S. enterica*, como descrito na tabela 1 (CDC, 2007f; POPOFF; LE MINOR, 2001; PORWOLLIK *et al*, 2004). A subespécie *enterica* agrupa mais de 60% dos sorovares e têm como principal habitat, o trato intestinal dos animais de sangue quente (aves e mamíferos), ao contrário dos demais sorovares e da espécie *S. bongori* que são encontradas no ambiente e em animais de sangue frio, raramente em pessoas (BRENNER, 2000; CDC, 2007f; FOTI *et al*, 2009; POPOFF, M.Y. *et al*, 2001).

Tabela 1. Distribuição dos sorovares de *Salmonella*.

Espécie e subespécie	Nº de sorovares
<i>Salmonella enterica enterica</i>	1490
<i>Salmonella enterica salamae</i>	500
<i>Salmonella enterica arizonae</i>	94
<i>Salmonella enterica diarizonae</i>	329
<i>Salmonella enterica houtenae</i>	72
<i>Salmonella enterica indica</i>	12
<i>Salmonella bongori</i>	22

Fonte: CDC (2007f)

3.2. Características morfológicas, isolamento e testes bioquímicos.

As salmonelas são bactérias Gram negativas, não capsuladas, em forma de bastonetes, que medem de 2 a 5 µm de comprimento, possuem flagelos peritriquiais e fímbrias, com exceção de *Salmonella* ser. Pullorum e *Salmonella* ser. Gallinarum que são imóveis. Em geral, as salmonelas são aeróbias e anaeróbicas facultativas, podendo crescer em temperaturas ótimas de 37°C e elevadas a 43°C, a qual é geralmente utilizada para a redução de seu crescimento (BRENNER *et al*, 2000; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

De acordo com protocolo de microbiologia clínica, os meios de cultura sólidos geralmente utilizados para o isolamento de *Salmonella* em laboratórios clínicos são Eosina-Azul de Metileno (EMB) e MacConkey (MC) que apresentam baixa seletividade para este gênero, os meios *Salmonella-Shigella* (SS), Hektoen Enteric (HE), Citrato-Desoxicolato são de média seletividade; Verde Brilhante (VB) e Bismuto-Sulfito são de alta seletividade para

isolar *Salmonella* de amostras de alimentos, mas, atualmente estes meios foram introduzidos erroneamente na microbiologia clínica (SILVA, 2008). Nestes meios, a maioria dos sorovares produzem colônias verdes ou amareladas com ou sem produção de ácido sulfídrico (H_2S) no centro da colônia ou ainda, colônias totalmente pretas (KONEMAN *et al*, 2006).

Nos últimos anos surgiram diversos meios cromogênicos e flurogênicos úteis para o isolamento e identificação presuntiva de *Salmonella* spp., mas não são utilizados com frequência devido ao seu alto custo. Um dos exemplos desses meios é o Agar Rambach, que foi o primeiro cromogênico a ser comercializado e ainda é utilizado na identificação de salmonelas não-tifóides, gerando colônias avermelhadas no meio (MANAFI; SOMMER, 1992; RAMBACH, 1990).

De modo geral em provas bioquímicas (Quadro 1), as salmonelas são lactose e sacarose negativas. Fermentam a D-glucose e outros carboidratos como L-arabinose, maltose, D-manitol e D-xilose, com produção de ácido e gás. Além das características gerais da família enterobacteriaceae, os testes de indol e ureia são negativos, o que diferenciam as salmonelas de outros grupos de enterobactérias, produzem lisina e ornitina descaboxilases. A maioria dos sorovares produz gás sulfídrico (H_2S) e utilizam o citrato do meio Citrato de Simmons (CS) como única fonte de carbono, com exceção de *Salmonella* Typhi e *S. Paratyphi* A, que são citrato negativos (YAN *et al*, 2003; SILVA, 2008).

Quadro 1. Identificação bioquímica para *Salmonella*.

Salmonelas	EPM					MLI			Citrato
	Lactose	Gás	H ₂ S	Urease	L-TD	Motilidade	Indol	Lisina	
<i>Salmonella</i> sp.	-	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>S. Choleraesuis</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>S. Typhi</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>S. Paratyphi</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-
<i>S. Galinarum</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>S. Pullorum</i>	-	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>subsp. salamae</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>subsp. arizonae</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>subsp. diarizonae</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>subsp. houtenae</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>subsp. indica</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	+
<i>S. bongori</i>	-	+	+	-	-	+	-	+	+

L-TD: L-triptofano desaminase; H₂S: gás sulfídrico; EPM: Escola Paulista de Medicina; MILI: Motilidade, Indol e Lisina. (Fonte: KONEMAN *et al*, 2001).

Os sorovares da espécie *S. enterica* podem causar diversas doenças em humanos, conhecidas popularmente como salmoneloses, que variam desde as gastroenterites leves até formas mais graves, como a febre tifoide ou febres entéricas.

As provas da hemocultura são utilizadas em caso suspeito de salmonelose e, para o diagnóstico laboratorial das enfermidades mais graves, faz-se o isolamento da bactéria para identificação do tipo de sorovar. A hemocultura tem alta sensibilidade durante a primeira semana da infecção, na terceira semana a cropocultura é o método mais utilizado para identificar o estado do portador e o método da mielocultura, que é um método mais invasivo e de maior sensibilidade para o isolamento de *Salmonella*, esta se mantém positiva mesmo quando o paciente já foi tratado com algum antimicrobiano e quando os exames de hemocultura e cropocultura não foram conclusivos, existindo ainda suspeita de febre tifoide no paciente (PARRY *et al*, 2002).

No diagnóstico da febre tifoide, utiliza-se também um método auxiliar, conhecido como reação sorológica de Widal que se baseia na quantificação dos antígenos somático (O) e flagelar (H) de *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi que irão reconhecer seus respectivos anticorpos no soro do paciente (HOUSE *et al*, 2001; NASCIMENTO, 2007).

A identificação e isolamento de *Salmonella* incluem tanto reações químicas quanto sorológicas, mas ainda existem erros nestes processos que precisam ser analisados, pois na maioria das vezes a administração dos medicamentos já iniciou antes mesmo de se saber o diagnóstico correto.

3.3. Epidemiologia de salmonelose tifoide e não tifoide

As salmonelas entéricas constituem importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo, apresentam distribuição cosmopolita e acometem todas as faixas etárias.

As salmonelas entéricas são responsáveis pela doença salmonelose, que se propaga pela água contaminada com fezes de humanos e de animais, por alimentos contaminados, principalmente àqueles de origem animal, como os derivados dos ovos, frangos e do leite (BRASIL, 2005b; WHO, 2008).

Desde o final dos anos 1990 e início dos anos 2000 quando houve muitos registros de salmoneloses em todo o mundo, alguns estudos como de Abbijit *et al* (2010); CDC (2007, 2008); Costalunga (2002); Crump *et al* (2004); Loureiro (2010); Petersen *et al* (2011) e Shenghui Cui *et al* (2009) foram desenvolvidos para explicar o comportamento do agente etiológico e os diversos fatores ambientais associados a essa doença.

Nos Estados Unidos, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças tem divulgado resultados sobre os surtos ocorridos em diferentes regiões do país e de acordo com seus achados, as infecções causadas por *Salmonella enterica* são responsáveis por 1,4 milhões de casos ao ano no país, resultando em aproximadamente 16.000 hospitalizações e 600 mortes, sendo as crianças menores de cinco anos de idade a faixa etária mais acometida e ainda, os sorovares Typhimurium e Enteritidis os mais frequentes, transmitidos principalmente por alimentos contaminados. Outros sorovares como, Newport, Mississippi e Javiana também

foram identificados em surtos nos últimos anos em vários países da América do Norte (CDC, 2007, 2008).

Em 2006, nos países da Europa foram confirmados mais de 168 mil casos de salmonelose, os países Islândia e Noruega apresentaram mais de 36 casos a cada 100 mil habitantes da população e, os sorovares *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* foram isolados com maior frequência assim como ocorreu nos Estados Unidos (ECDC, 2008).

No norte da Espanha, 14 casos de infecção pelo sorovar *S. Paratyphi B* foram identificados pela unidade de epidemiologia do Departamento de Saúde Pública do país entre os anos de 2009 e 2011, associados a estes achados estavam o contato com répteis e aquários de peixes tropicais comumente criados em domicílio.

No Brasil, em um levantamento epidemiológico realizado pelo Centro de Vigilância epidemiológica do Ministério da Saúde, mais de 3500 amostras de *Salmonella* de diferentes regiões do país foram isoladas no período de 2000 a 2005 e, dentre estas, estavam os sorovares Enteritidis e Typhimurium, como os mais frequentes, *S. Typhi* isolado na região norte, Dublin, Infantis, Agona, Panama e ainda outros 60 sorovares não identificados (CARNEIRO, 2009).

Os sorovares Heidelberg, Newport, Montevideo e Saintpaul também são prevalentes em surtos de salmonelose humana, pois têm os seres humanos e os animais como hospedeiro, sendo propagados através dos alimentos contaminados (ABBIJIT *et al*, 2010; FERNANDES, 2006; MÜRMAN *et al*, 2008; SHENGHUI CUI 2009; WELKER *et al*, 2009).

Doenças transmitidas por alimentos contaminados, como a salmonelose, têm sido investigadas com frequência no sul do Brasil. Na cidade do Rio Grande do Sul, Costalunga & Tondo (2002) descreveram os surtos de salmonelose ocorridos na região, apresentando 36% dos surtos entre o período de 1997 a 1999, aumentando essa frequência para 75% nos anos seguintes, de acordo com o estudo de Nadvorny *et al*, (2004). A fonte de infecção desses

surtos foram os produtos de origem avícola, que desde o início dos anos 90 têm apresentado problema na produção e conseqüentemente problemas para a saúde pública nessa região.

Souza (2008) identificou 16 diferentes sorovares de *Salmonella* ao avaliar cepas isoladas de pacientes e de alimentos no Paraná e em uma pesquisa de sete anos, confirmou *S. Enteritidis* como o sorovar mais frequente. Neste estudo também foram isolados *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Derby* e, de acordo com seus achados, *Salmonella* estava associado a elevados índices de bacteremia em crianças (57,1%) com resistência bacteriana. No ano seguinte, Carneiro (2009) obteve resultados semelhantes ao analisar cepas isoladas de fonte humana e ambiental na região Nordeste do Brasil.

Em recém-nascidos e crianças que apresentam atrasos de crescimento tanto em regiões brasileiras como estrangeiras, doenças infecciosas como a salmonelose e a desnutrição que as acompanha são responsáveis por uma parte das 13 milhões de mortes e, também da diminuição da resistência a outras infecções, determinando assim que a criança entre em um ciclo vicioso de infecções e de má nutrição (CDC, 2007).

A salmonelose apresenta casos graves com sintomas de febre alta, conhecidas como febres entéricas ou febre tifoide. A febre tifoide ocorre de forma endêmica, com epidemias principalmente nas regiões norte e nordeste do Brasil, estando associada a baixos níveis socioeconômicos e de saneamento básico, de acordo com levantamentos realizados pelo Sistema de Vigilância em Saúde.

No ano 2000, os sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi* foram os responsáveis por mais 2 milhões de casos de febre tifoide no mundo, resultando em 216 mil mortes, sendo que mais de 90% desses casos ocorreram na Ásia (CRUMP *et al*, 2004; CDC, 2007; WILDE, 2007).

Os registros de *S. Typhi* e *S. Paratyphi* no sudoeste da Ásia iniciaram desde 1999 e, entre 2002 e 2003 *S. Paratyphi* A foi o sorovar responsável pela alta incidência de febres entéricas em regiões da Indonésia (14%), Paquistão (15%), Índia (24%) e na China (64%), de

acordo com estudo realizado por Leon Ochiai e colaboradores (2005). Nos estudos de Gupta *et al* (2009), citam que na Índia, o sorovar *S. Paratyphi A*, que causa a forma mais grave da doença, já apresenta baixa frequência nos últimos anos.

Devido ao alto índice de febre tifoide, desde o ano 2006 a doença passou a fazer parte da lista de notificação obrigatória do Sistema Único de Saúde (SUS) e, de acordo com dados epidemiológicos disponíveis a partir desse período, os casos predominam no sexo masculino (55%) e na região norte (51,3%), sendo a maioria dos casos notificados no Estado do Pará (BRASIL, 2007).

Em consequência de diversos fatores envolvidos com a doença salmonelose ou febre tifoide, estudos epidemiológicos começaram a ser desenvolvidos. Na cidade de Santos/SP foram notificados dois casos de febre tifoide em 2004 por iniciativa de um levantamento epidemiológico. Estudos desse tipo e principalmente aqueles que retratam a infecção humana estão baseados na caracterização do sorotipo, descrevendo seu comportamento no ambiente e no hospedeiro, portanto, em 2005, o Conselho de Epidemiologia aprovou um documento em que todos os laboratórios têm que analisar os casos e relatar os sorotipos envolvidos nos casos confirmados de salmonelose (CDC, 2008).

Ainda há falta de informações epidemiológicas das salmoneloses em animais domésticos, os gatos e cães são importantes reservatórios de *Salmonella*, mas não apresentam sintomatologia, apresentando risco para as pessoas amadoras desses animais.

Foi descrito no trabalho de Maciel *et al* (2004) que a prevalência de assintomáticos foi de 83,3% em cães, na Bahia. Esses animais representam risco para idosos e crianças que costumam tê-los em sua companhia e, ainda nesse grupo de pessoas fica mais difícil controlar os hábitos de higiene, favorecendo a transmissão e proliferação do agente.

O conhecimento dos sorovares de *Salmonella* envolvidos em surtos tanto no Brasil como em outros países são de grande relevância, facilitando o trabalho de controle e prevenção dessa doença.

3.4. Sensibilidade aos antimicrobianos

O perfil da resistência aos antimicrobianos passou a ser uma ferramenta importante na caracterização das linhagens resistentes, colaborando para o uso adequado do antibiótico, evitando falhas no tratamento.

A salmonelose é comumente tratada com os antibióticos ciprofloxacina, cloranfenicol, ampicilina, ácido nalidixico, ofloxacina e amoxicilina (NCCLS, 2003).

Alguns sorovares já apresentam multirresistência, como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* e *S. Panama* (BRITO, 2010; YANG et al 2002) e isso tem sido estudado com maior prioridade. Threlfall (2002) também destacou a resistência dos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Hadar* a ciprofloxacina na Inglaterra.

Em uma conferência realizada na Suíça em 2010, a Agência de Proteção a Saúde do Reino Unido, descreveu o aumento da resistência às quinolonas e cefalosporinas, principalmente entre sorovares isolados de aves e também de isolados de porco e seus derivados, que têm causados alguns surtos em países europeus (CASADESÚS, 2010).

No sul da Ásia, foi realizado um levantamento de febre tifoide em 58 pacientes, dentre os diferentes sorovares identificados, *S. Typhi* e *S. Choleraesuis* foram os sorovares mais comuns. Nos testes de antibiograma, *S. Typhi* foi sensível a ciprofloxacina e *S. Choleraesuis* apresentou resistência a azitromicina, tornando difícil o tratamento dessa doença, já que são drogas preconizadas para o tratamento desse tipo de doença (VLIEGHE *et al*, 2012).

No Brasil, Ribeiro *et al* (2006), ao analisar cepas isoladas de aves no Estado do Paraná, descreveu que o sorovar *S. Hadar* apresentou um percentual alto de resistência a

estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e ácido nalidíxico, apresentando sensibilidade só a ciprofloxacina. Resultados semelhantes foram obtidos por Cortez *et al* (2006) em São Paulo que, além dos antibióticos já citados, as salmonelas apresentaram resistência a aztroenam, ampicilina e sulfazotrim.

Em um estudo recente de Souza *et al* (2010), salmonelas isoladas de pessoas no Estado do Pará apresentaram resistência aos antibióticos cloranfenicol, ác. nalidixico, nitrofuratoína, sulfametaxazol e tetraciclina, comumente usados no tratamento de salmonelose.

No Estado do Amazonas, uma criança com onze dias de febre alta foi diagnosticada com *S. Typhi* e mesmo após o tratamento com cloranfenicol, os sintomas continuaram (ALECRIM *et al*, 2002). Este fato passou a ser considerado como primeiro caso de resistência *in vivo* e *in vitro* de *S. Typhi* ao cloranfenicol para Amazônia brasileira.

No Brasil, a resistência bacteriana é muito estudada, principalmente quando o agente da doença apresenta endemicidade e alto poder de letalidade. No caso de resistência de *S. Typhi* ainda não existem muitos registros que comprovem essa informação e também a maioria dos estudos de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. estão voltados aos sorovares isolados de fonte ambiental e de animal (OLIVEIRA *et al*, 2005; OPS, 2005).

Os sorovares isolados de animais apresentam resistência aos antimicrobianos porque muitos antibióticos além de serem utilizados para tratamento de suas doenças, também são utilizados como suplementos para o rápido crescimento do animal. Já os sorovares isolados de pessoas, apresentam resistência porque geralmente se administra um antibiótico comum a qualquer problema gastrointestinal, sem saber qual o agente etiológico da doença, continuando com a administração do antimicrobiano incorreto para este tipo de doença, possibilitando que esse agente passe a ser multirresistente.

3.5. Patogenia e virulência de *S. enterica*

O gênero *Salmonella* sp. é representado por microrganismos entéricos capazes de causar doença e assim como qualquer outro patógeno, está em contínua modificação para se adaptar e manter-se no ambiente, apresentando seus variados fatores de virulência como principal recurso para sua sobrevivência no interior das células hospedeiras.

As salmonelas têm os seres humanos e os animais como seu reservatório natural e para sobreviver dentro desses organismos, invadem o epitélio intestinal, alcançando a lâmina própria, que é a região onde as células epiteliais estão ancoradas, como por exemplo, as células M. Se o sistema imune responder a entrada desses patógenos, evita as infecções sistêmicas em órgãos como o fígado e tecidos linfáticos, diminuindo a liberação de água e eletrólitos estimulados pelas glândulas secretoras, evitando as diarreias aquosas e sanguinolentas, permitindo que ocorra apenas uma gastroenterite (FRANCO; LANDGRAF, 1996; OHL; MILLER, 2001). (Figura 1).

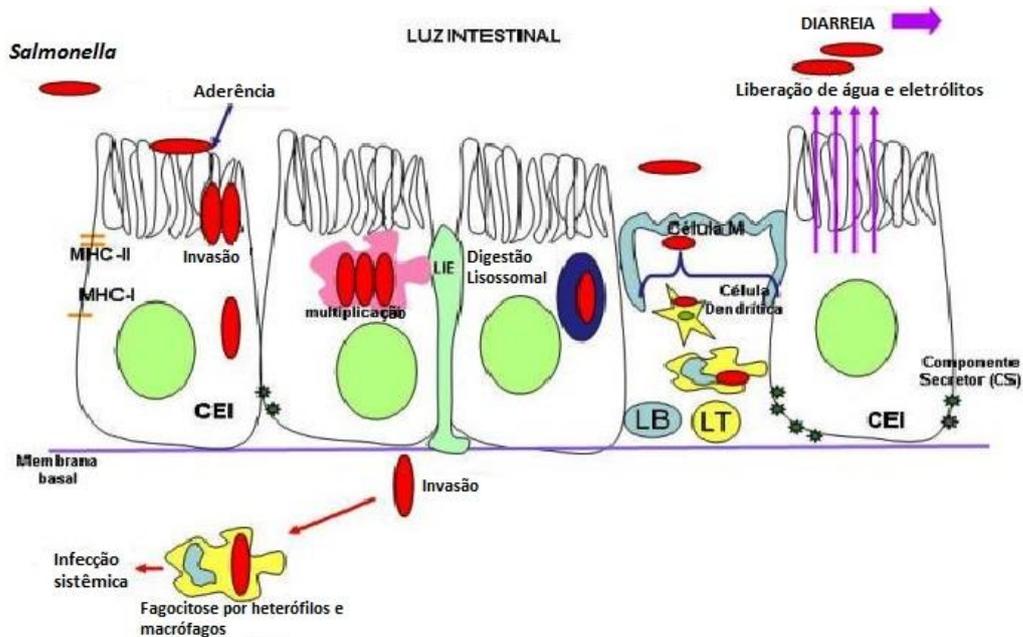


Figura 1. Mecanismo de colonização do trato intestinal por *Salmonella*. (Fonte: www.veterinariadigital.com (modificado)).

A infecção por *Salmonella* sp. é determinada pelo estado do hospedeiro e pela capacidade invasiva da bactéria, entretanto, alguns fatores genéticos determinam a susceptibilidade do hospedeiro, enquanto a capacidade da bactéria é determinada pelos fatores de virulência que cada uma possui (FRANCO; LANDGRAF, 1996; PEREZ, 2008; VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

Esses fatores de virulência nas salmonelas estão presentes nos flagelos e fimbrias, na capacidade de mobilidade, capacidade para passar pela barreira intestinal, capacidade de invadir as células, se reproduzir no epitélio intestinal e produção de toxinas (substâncias capazes de causar danos ao organismo animal), além de outras características também descritas na Tabela 2 (RODRIGUES, 2005).

Tabela 2: Genes usados na identificação da virulência de *Salmonella* e suas características.

Genes	Tam (pb)	Características	Referência
fliC	404	Motilidade, invasão e aderência.	Carneiro <i>et al</i> , 2009
phoP/Q	299	Sobrevivência no interior do macrófago; regulador.	Miller; Kukral; Mekalanos, 1989
slyA	700	Sobrevivência no macrófago e transcrição de proteínas; regulador.	Soto <i>et al</i> , 2000
aceK	240	Codifica a enzima bi-funcional reguladora de isocitrato (IDHK/P)	O'Regan <i>et al</i> , 2008
sfdA	146	Componente do sistema transportador de ferro.	Carneiro <i>et al</i> , 2009
spvC	571	Plasmidial	Chiu; Ou, 1996
invA	244	Invasão	Chiu; Ou, 1996
fimA	385	Aderência	Carneiro <i>et al</i> , 2009
agfA	241	Aderência	Carneiro <i>et al</i> , 2009

Alguns desses fatores de virulência estão restritos às regiões específicas do cromossomo da bactéria, conhecidas como Ilhas de Patogenicidade (extensos trechos cromossômicos das bactérias que atuam no momento da infecção), designadas SPIs (Ilhas de patogenicidade de *Salmonella*) e cada ilha apresenta uma função específica (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005). Já foram identificadas mais de oito ilhas de patogenicidade em *Salmonella*, sendo as cinco primeiras ilhas (SPI- 1 a SPI5) as mais estudadas, pois, codificam os fatores de virulência relacionados à invasão, inflamação e secreção de substâncias que caracterizam a fase entérica da infecção (MARCUS *et al*, 2000).

Fatores de virulência como os genes *invA*, *fliC*, *fimA*, *agfA*, *phoP*, *slyA*, *aceK*, *spvC*, *sfdA* e *sdf* são genes muito utilizados para detecção da virulência de *S. enterica*, pois estão envolvidos na invasão, aderência, motilidade e sobrevivência no momento da infecção e podem ser encontrados em diferentes regiões cromossômicas da bactéria (CARDONA; CASTRO *et al*, 2009; CARNEIRO *et al*, 2009; CHIU; OU, 1996; O`REGAN *et al*, 2008).

Para causar infecção o primeiro passo é invadir as células do epitélio intestinal. Para isto possuem fatores de virulências específicos que atuam nesse processo, como acontece com o *invA*, gene conservado em *Salmonella* que atua na invasão celular (OLIVEIRA *et al*, 2003) e também o gene *fliC*, encontrado nos flagelos da bactéria, que além de auxiliar na invasão, atua também na aderência e motilidade no interior da célula hospedeira (CARNEIRO, 2009).

De acordo com Bhatta *et al*, (2007), o gene *inv* apresenta cinco grupos (A, B, C, D e E) e todos sempre estão presentes em *Salmonella enterica*, o que ajuda na diferenciação em relação a outras cepas bacterianas, principalmente para diferenciar estas de *Escherichia coli*. Estes genes estão presentes nas SPIs I e II, onde são encontrados todos os mecanismos para invasão e multiplicação da bactéria (BUENO, 2010).

Outro gene utilizado para diferenciar *Salmonella* de outros gêneros bacterianos é o gene *aceK*, pois tem como função controlar o fluxo do isocitrato no interior das células (SUKHNANAND *et al*, 2005). Nelson *et al*, (1997) em um estudo realizado com *Salmonella* e *Escherichia coli*, utilizaram este gene *ace* (K e A) para verificar quais diferenças ocorriam nas sequências nucleotídicas destas bactérias, e observou que houve variação nessas sequências, sendo que em *S. enterica* havia maior número de bases, mas, mesmo assim, este gene atuou com igual função nas duas cepas.

Outros mecanismos utilizados para patogenia de *Salmonella* são os pequenos filamentos fimbriais que estão presentes na superfície da bactéria, auxiliando no momento da aderência e a persistência da bactéria às células epiteliais durante a infecção. As salmonelas

apresentam diferentes tipos de fimbrias que são utilizadas para detectar sua virulência, sendo as fimbrias do tipo I (*fimA*) e fimbrias agregativas (*agfA*) frequentemente utilizadas para esse tipo de estudo (BISHOP *et al*, 2006).

Além dos fatores já citados, *Salmonella* sp. possuem fatores de virulência que as mantêm viva no interior do macrófago e que regulam o processo inflamatório no interior das células. Os genes *phoP* e *slyA* são genes utilizados para observar essas características em salmonelas entéricas. Soto *et al* (2001) observou a presença do gene *slyA* na maioria das cepas de *S. Panama* provenientes de infecções entéricas em pessoas. Merighi *et al* (2005) em um de seus estudos *in vivo* de *Salmonella* Typhimurium em roedores, observou que o gene *phoP* também pode ser encontrado no meio extracelular.

Embora nem todos os sorovares de *Salmonella* possuam um plasmídio de virulência, Van Asthen e van Dijk (2005) descreveram mais de seis sorovares (*Salmonella* Arbotusovis, *S. Galinarum*, *S. Pullorum*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* e *S. Dublin*) que já apresentam este mecanismo. Estes sorovares agregam o gene plasmidial de virulência *spvC*, o qual é ativado para sobrevivência da bactéria em ambientes desfavoráveis como por exemplo, em ambiente de pH ácido que limita seu crescimento.

O gene *sfdA* é um componente do sistema transportador de ferro que no momento da infecção é ativado por proteínas ligantes para obter a quantidade de ferro necessário requerido pela bactéria no momento da infecção (CARNEIRO, 2009). A função do gene *sdf* ainda é desconhecida, mas, é utilizado para detectar especificamente o sorovar *S. Enteritidis* (CARNEIRO *et al*, 2009; CHIU; OU, 1996; O`REGAN *et al*, 2008).

Estudos bacterianos do comportamento celular e molecular de *S. enterica* (BARMAN *et al*, 2008; BONALLI *et al*, 2011; CASADESÚS, 2010; CHART *et al*, 2007; DIAS *et al*, 2007; PETERSEN *et al*, 2011; WINTER *et al*, 2010) descrevem que essa espécie utiliza estratégias específicas de virulência no momento da infecção, que ajuda a penetrar na barreira

intestinal, atuando como parasita intracelular e interagindo com as células do sistema imune (GUINEY, 2005).

Os genes de virulência variam de acordo com o tipo de sorovar e cada um desempenha uma função diferente no organismo, podendo desencadear sintomatologia leves ou avançadas, dependendo do sistema imune do hospedeiro infectado.

3.6. Métodos de Tipificação de *Salmonella enterica*

Atualmente métodos de caracterização fenotípica e moleculares têm sido destaques em pesquisas com *Salmonella* sp. e outras enterobactérias. Embora existam métodos tradicionais para a identificação e caracterização dessas espécies, ainda há necessidade de técnicas inovadoras e eficazes para sua descrição.

Métodos fenotípicos reportam as reais expressões do genótipo e determinam como o organismo consegue realizar uma reação química dentro de um hospedeiro (CASE *et al*, 2011). Resistência aos antimicrobianos (CRUMP, 2010; DIAS *et al*, 2007; SHENGHUI CUI *et al*, 2009), fagotipagem, baseada nos estudos do bacteriófago (DIAS *et al*, 2007; LIEBANA *et al*, 2002) e sorotipagem, baseada nas análises dos antígenos O, H e Vi (CHART *et al*, 2007; LOUREIRO 2010) foram os métodos fenotípicos mais utilizados para a caracterização de salmonelas entéricas identificadas em casos de salmonelose ocorridos nos últimos 10 anos e apresentaram resultados significativos.

Em *S. Typhimurium* a fagotipagem é um método preciso na diferenciação com outras cepas, pois apresenta o antígeno O5 que suas variantes não possuem, portanto trata-se de um método eficaz para caracterização desse sorotipo (RABSCH *et al*, 2002).

Técnicas como, Reação em cadeia de polimerase (SHENGHUI CUI *et al*, 2009; ZOU *et al*, 2011), Repetitive extragenic palindromic elements (OLIVEIRA *et al*, 2007), Randomly amplified polymorphic DNA fingerprints, Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase

Chain Reaction (D'SOUZA *et al*, 2009) e Pulsed field gel electrophoresis (CHEN *et al*, 2011; PETERSEN *et al*, 2011; SHENGHUI CUI *et al*, 2009) são exemplos de métodos moleculares que permitem a tipagem rápida de microrganismos entéricos e frequentemente são utilizadas como ferramentas na identificação e classificação de diversas bactérias entéricas.

Paralelo às análises de caracterização fenotípica são realizadas análises moleculares, que são cada vez mais eficientes, permitindo fazer uma identificação rápida e precisa do tipo de patógeno envolvido em diversos tipos de doenças, através da observação do seu material genético. A técnica da Reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma das ferramentas mais utilizadas em estudos do *DNA* bacteriano.

A técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) faz o processo de separação de grandes moléculas de DNA pela sua carga elétrica, formando bandas ou faixas que reúnem fragmentos semelhantes do DNA. No PFGE, ao invés de se aplicar um único campo elétrico uniforme através do gel, são aplicados pulsos de dois campos separados em um ângulo de 90°, possibilitando a separação de grandes fragmentos de DNA, diferente daqueles que são separados na eletroforese comum (RIBOT *et al*, 2009).

De acordo com D'Souza *et al* (2009) e O'Regan *et al* (2008), a técnica em tempo real apresenta alto potencial para análise rápida de salmonelas em produtos alimentícios, principalmente de alimentos frescos dos suínos e das aves, comumente contaminados com os sorovares *S. Choleraesuis* e *S. Enteritidis*, respectivamente.

É de suma importância o uso de métodos fenotípicos e genotípicos na detecção de *Salmonella* para se obter a descrição rápida e correta do patógeno envolvido em surtos e para aplicação de medidas preventivas relacionadas a população.

4. Material e Métodos

Este estudo utilizou cepas de *Salmonella* provenientes de uma área rural e uma área urbana da cidade de Manaus/AM. As amostras da área rural foram coletadas no ano de 2009 e as da área urbana em 2011, conforme os protocolos dos comitês de ética em pesquisa em anexo. Para levantamento sócio-epidemiológico, uma ficha individual/ questionário epidemiológico, assim como termos de consentimentos foram preenchidos por responsáveis após as explicações desta pesquisa (Anexos 1 a 4).

4.1. Local de estudo: área urbana

Foi realizado um estudo com crianças atendidas em dois hospitais públicos infantis de Manaus, Pronto Socorro da Criança Zona Sul e Pronto Socorro da Criança Zona Leste, os quais atendem a população infantil carente da capital e de cidades vizinhas. A coleta foi realizada três vezes na semana, no período de fevereiro a junho de 2011.

Amostras fecais e informações foram obtidas de crianças na faixa etária de 0 a 10 anos de idade. Para os participantes do grupo caso, foram obtidas amostras de fezes de crianças que apresentavam um quadro clínico de diarreia e para o grupo controle, amostras fecais de crianças que há um mês não apresentaram diarreia e estavam no Pronto Socorro por outras razões.

Para a seleção das amostras fecais de crianças de ambos os sexos, foram estabelecidos os seguintes critérios clínicos:

- ✓ Foi estabelecida como diarreia aguda à mudança abrupta do hábito intestinal, caracterizada pela eliminação de três ou mais evacuações líquidas ou amolecidas por um período de 24 horas, com duração máxima de mais de dois dias a uma semana de etiologia presumivelmente infecciosa. Não se considerou como portadoras de diarreia aguda, crianças

que apresentaram alteração do hábito intestinal, em consequência de emprego de medicamentos, como por exemplo, antibióticos e sais de ferro ou que apresentaram outros distúrbios do tubo digestivo, como por exemplo, a síndrome do cólon irritável.

✓ Para compor o grupo dos controles foram selecionadas crianças pertencentes à mesma faixa etária do caso diarreico e que não apresentaram sinais ou sintomas gastrintestinais (vômito e diarreia) nos últimos trinta dias anteriores à coleta das fezes, além de necessariamente não estarem fazendo uso de antibióticos. Essas crianças foram atendidas nos hospitais por outras queixas e razões.

✓ Considerou-se como febre, temperatura axilar acima de 37°C quando verificada na sala de triagem ou quando referida pela mãe. A desidratação foi diagnosticada pelo profissional médico responsável. A presença ou ausência de vômito foi relatada pelo responsável da criança. A presença de sangue nas fezes foi observada no momento da coleta.

As amostras foram coletadas por evacuação espontânea e em seguida acondicionadas em recipientes apropriados. Para o isolamento de *Salmonella* sp., selecionou-se imediatamente a parte mais líquida com muco e/ou sangue das fezes com auxílio de um swab estéril de algodão, que foi passado sobre as fezes e inserido dentro de tubos de vidro contendo meio de crescimento e enriquecimento Tetratonato de sódio, de acordo com metodologia descrita por Carvalho & Ferrarini (2000).

4.2. Local de estudo: área rural

Para a coleta das amostras da área rural, foi realizado um estudo descritivo de prevalência com a população da comunidade rural Rio Pardo. Esta comunidade pertence ao Município de Presidente Figueiredo/AM, habitada por uma população de aproximadamente 550 indivíduos, distribuídos em áreas de igarapé e ramais de terra (Figura 2 e 9). Esta comunidade é desprovida de saneamento básico, água potável e coleta de lixo diariamente, o

que permite a proliferação de microrganismos infectantes além da presença de abutres nos lixos jogados próximos as residências.

Plano do assentamento do Rio Pardo

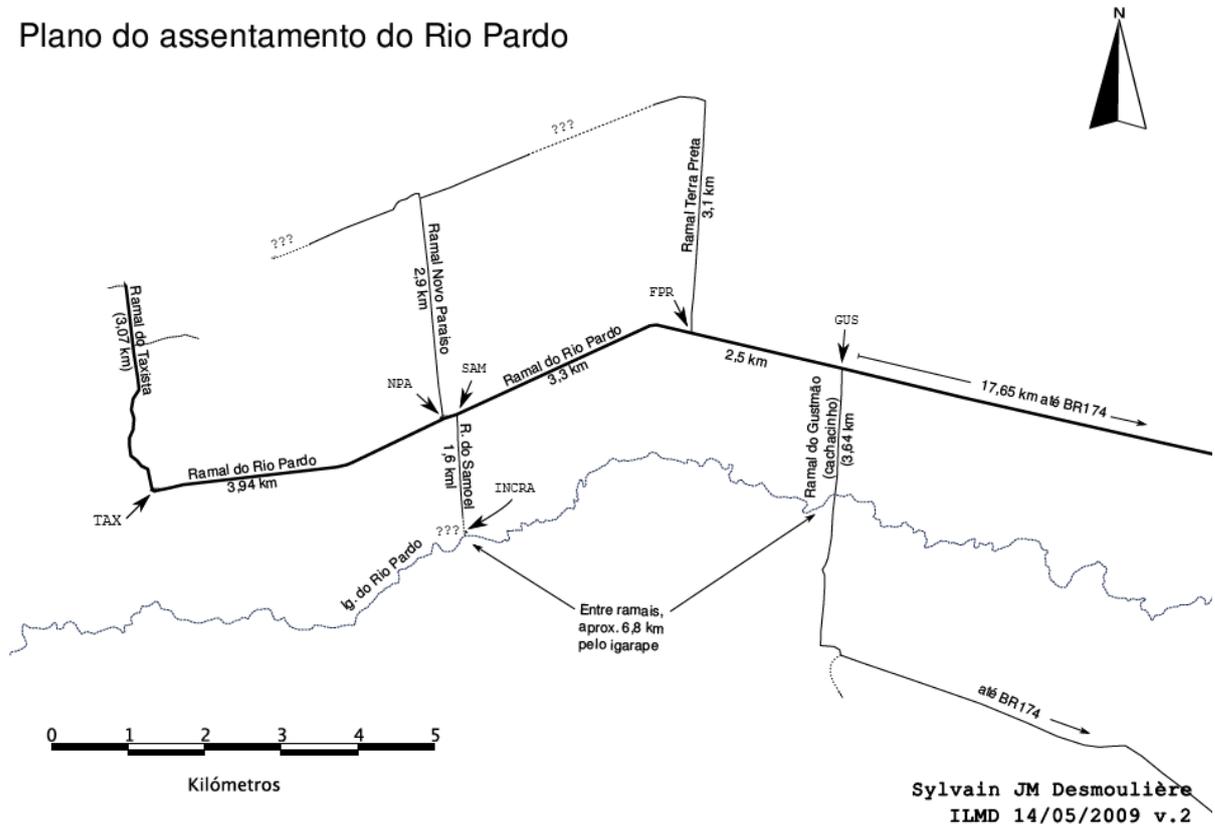


Figura 2. Plano de assentamento da comunidade Rio Pardo/AM. (Fonte: Sylvain JM Desmoulière)

Obs: As setas indicam os ramais da comunidade.

A busca por *Salmonella* entérica da área rural foi feita em três diferentes origens amostrais: da água que utilizam para o consumo diário, de fezes de pessoas (crianças e adultos) e de fezes de animais domésticos saudáveis ou não, em quarenta residências selecionadas de acordo com 4 critérios utilizados para dar significância a amostragem de aproximadamente 300 famílias que compõem a comunidade de Rio Pardo/AM: 10 Casas com crianças e com animais; 10 Casas com crianças e sem animais; 10 Casas sem crianças e com animais e 10 Casas sem crianças e sem animais. Durante a pesquisa foram observadas quatro diferentes fontes de água que a população utiliza para o consumo diário: água do igarapé, de cacimbas, de poços e das nascentes.

Foram coletados 2 litros de água de cada fonte de acordo com o que está preconizado pela legislação em relação a coleta de água. Em cada residência foi levado em conta o relato do responsável que consta no questionário. Existem casos que os moradores utilizavam duas fontes diferentes de água por residência e ainda, casos onde as fontes eram comuns a mais de uma residência. Estas amostras foram armazenadas em garrafas estéreis e acondicionadas adequadamente para posterior análise microbiológica no laboratório.

Foram coletadas amostras de fezes dos animais domésticos, assim como das pessoas que moravam nas residências que participaram do estudo. Em relação aos animais, quando na residência encontrava-se mais de três animais da mesma espécie, só foram coletadas até três amostras.

Para o estudo bacteriológico nas fezes, as bactérias foram imediatamente crescidas em meio diferencial e posteriormente diagnosticadas. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento, passaram por entrevista para obter as informações individuais e também foi feito o levantamento de dados físicos de cada residência participante (Anexos 1 e 3).

4.3. Análises laboratoriais para a caracterização de *Salmonella*

Os trabalhos laboratoriais de todas as amostras foram realizados no Laboratório de biodiversidade do Instituto Leônidas e Maria Deane – ILMD/Fiocruz Amazônia.

Para o isolamento dos microrganismos da água, inicialmente foi feita uma filtração com bomba a vácuo, utilizando membrana de celulose Millipore de 0,45 µm e 0,22 µm. Após a filtração essa membrana foi inserida em tubos de vidro contendo meio de crescimento líquido e incubados a 37°C por 24 horas.

Os espécimes clínicos das fezes, tanto da área urbana como rural, foram imediatamente semeados em meios líquidos apropriados para cultivo bacteriano por 24 horas em estufa a 37°C. Após este período, foram semeados em placas de Petri contendo diferentes

meios de cultura para isolamento de enterobactérias: Agar *Shigella-Salmonella* (SS) e Hektoen, meios seletivos para o gênero *Salmonella*, Agar Verde Brilhante (VB), Agar MacConkey (MC), Agar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD) e *Pseudomonas* isolation Agar (PIA), incubados a 37°C por 24 horas (CARVALHO; FERRARINI, 2000). Passada às 24 horas, uma colônia não fermentadora de lactose (lac -) com características típicas de *Salmonella*, foi armazenada.

Geralmente as colônias de *Salmonella* apresentavam cor transparente e às vezes centro negro, evidenciando a formação de ácido sulfídrico (H₂S) no meio Agar SS (Fig. 2A). No meio Hektoen apresentaram cor verde e também algumas amostras apresentaram o centro negro (Fig. 3B). Já no meio VB, as colônias eram grandes, brancas, avermelhadas ou amareladas (Fig. 3C), no meio XLD as colônias eram grandes avermelhadas com centro negro ou totalmente preta (Fig. 3D). Em Agar MC e PIA as colônias eram pequenas e amarelas claras. De acordo com protocolos de identificação da Probac do Brasil e meios de cultura usados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Todas as colônias foram separadas para posterior caracterização bioquímica.

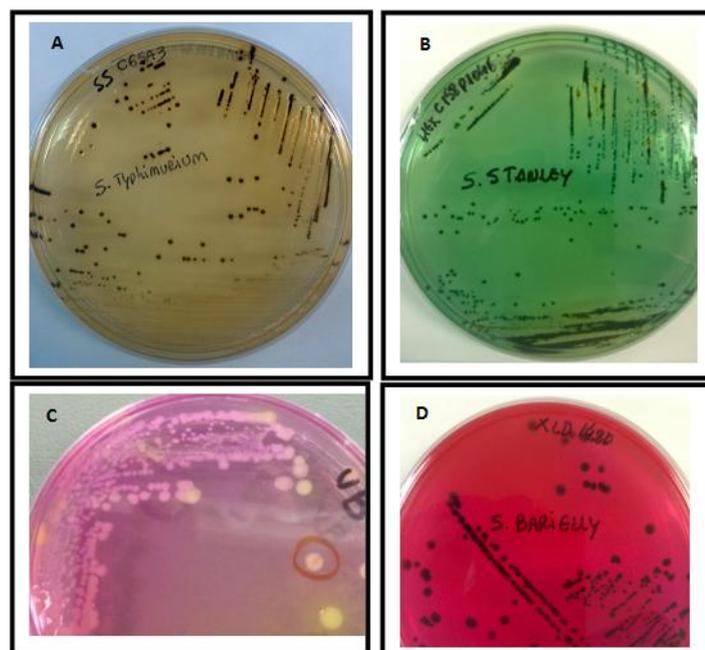


Figura 3. Meios de cultura em placa para o isolamento de *Salmonella* sp. A- *S. Typhimurium* no meio SS; B- *S. Stanley* no meio HEK; C- *S. Choleraesuis* no meio VB; D - *S. Barielly* no meio XLD. (Fonte: Santa-Rita, A.M.)

4.3.1. Teste bioquímico

Todas as colônias lac- selecionadas nos diferentes meios de isolamento para enterobactérias, foram individualmente semeadas nos testes bioquímicos EPM, MILi e Citrato de Simmons (Fig. 4), incubadas à temperatura de 37°C durante 24 horas (CARVALHO; FERRARINI, 2000). Esses três meios, totalizam oito provas bioquímicas. No meio EPM é possível verificar a produção de gás, urease, ácido sulfídrico e triptofano desaminase, no meio MILi pode-se observar a motilidade, lisina e indol. No citrato observa-se a utilização ou não do carbono como única fonte de carbono. Após 24 horas, foi realizada a leitura dos testes utilizando a tabela de leitura descrita pela Probac do Brasil (Quadro 1). Os resultados das reações bioquímicas observadas nos meios de identificação, anteriormente referidos, permitiram o diagnóstico presuntivo dos gêneros e eventualmente das salmonelas isoladas.



Figura 4. Meios bioquímicos EPM, MILI, Citrato. (Fonte: Santa-Rita, A.M.).

4.3.2. Caracterização do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

A suscetibilidade aos antibióticos foi testada de acordo com as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2009) pela técnica de difusão com discos comerciais (Oxoid). Foram testados onze antimicrobianos: ácido nalidíxico - NAL (30µg), ciprofloxacina - CIP (5µg), cloranfenicol - CLO (30µg), nitrofurantoína - NIT

(300µg), gentamicina - GEN (20µg), Amicacina – AMI (30µg), Norfloxacin – NOR (10µg), sulfametaxazol + trimetropima – SUT (23,75/1,25µg), aztreonam – ATM (30µg), piperacilina + tazobactam – PPT (110µg), amoxicilina/ ác. Clavulânico – AMC (20/10µg). Para a realização do teste, cada amostra foi reativada em meio sólido SS e Hektoen, incubadas à 37°C por 12-18 horas, de onde foram selecionadas 5 colônias do mesmo tipo morfológico. Essas colônias foram transferidas para um tubo contendo 3mL de caldo LB e incubadas à 37°C por cerca de 2 a 6 horas até alcançar a turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (1,5 X 10⁸ UFC/mL), de acordo com protocolo da ANVISA.

As suspensões bacterianas para o teste de difusão em disco foi feita com meio Agar Mueller Hinton (AMH), onde cada cultura foi semeada de forma homogênea em placas, para obtenção de crescimento confluyente. Até 15 minutos após a semeadura, os discos contendo os antibióticos foram adicionados com auxílio de uma pinça esterilizada, incubadas à 35°C por 18-24 horas. Após esse período, foram adicionados 10 ml de cloridato de trifetil tetrazólio (CTT) na superfície de cada placa para observações e leituras dos halos de inibição.

A leitura do diâmetro dos halos foi feita com um paquímetro, observando como resultado, sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) comparando com a tabela padrão, segundo as recomendações do CLSI (2009).

4.3.3. Extração do DNA

Após o isolamento das salmonelas por metodologia clássica descrita anteriormente, foram analisadas por biologia molecular para confirmação dos resultados.

Uma alça da cultura armazenada em meio sólido foi transferida para um tubo contendo 3 mL de meio LB líquido e incubado à 37°C por 24h. Da cultura bacteriana crescida foi transferido para um microtubo contendo 500µL de H₂O MilliQ autoclavada e resuspensa vigorosamente em homogeneizador (tipo vórtex – Daigger Vortex Genie 2). A suspensão foi

centrifugada em mini - centrífuga (mini Spin-Eppendorf) a 12000 rpm por 10 minutos à 4°C. Descartou-se o sobrenadante e resuspendeu o pellet em 200µL de H₂O ultrapura. A suspensão foi fervida a 100°C por 10 minutos em banho seco (Dry Bath), depois choque térmico a -4°C por 10 minutos. Centrifugou-se novamente por mais 10 minutos, retirou o sobrenadante em um novo tubo e iniciou-se o processo de limpeza com etanol 70% por duas vezes repetidas. O pellet foi resuspenso em TE (Tris-EDTA) e congelado a -20°C em freezer, de acordo com método de Otsuki *et al* (1997) com algumas modificações.

4.3.4. Sequenciamento do gene 16s

O gene 16s é um gene universal, sensível e muito utilizado em estudos de caracterização molecular bacteriana. Para sua amplificação foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores: 530 F (5'-TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG - 3' e 1492R (5'- TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA CGM YTT-3') recomendados por Borneman & Triplett (1997) e destacados esquematicamente na figura 5 para visualização das regiões conservadas V3 e V9 de anelamento dos iniciadores.

O isolamento foi realizado nas seguintes condições: 40 ng de DNA, 5,0 Mm de tampão 10X (Invitrogen), 0,25 mM de dNTPs (Invitrogen), 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 10 mM de cada *primer* (Invitrogen), 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), água deionizada esterilizada para um volume total de 25 µL. Foi feito uma reação PCR simplex em termociclador (Eppendorf Mastercycle Gradient) composto pelos seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos seguida de ciclo de 30 vezes com um passo de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento dos *primers* com temperatura a 59°C por 45 segundos e um passo de extensão das fitas a 72°C por 1,5 minutos, além de um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos da reação da PCR foram analisados quanto a sua qualidade e concentração por eletroforese utilizando gel de agarose a 1% corado com

brometo de etídio (0,5 mg/mL) e visualizado sob luz ultravioleta e foto documentado (OTSUKI *et al*,1997).

A purificação do DNA foi feito com Polietilenoglicol (PEG) de acordo com protocolo descrito por Lis (1980) modificado por Paithankar & Prasad (1991), em seguida as amostras foram enviadas para o sequenciamento na plataforma da FIOCRUZ/CPqGM/Bahia, com os indicadores descritos na tabela abaixo.

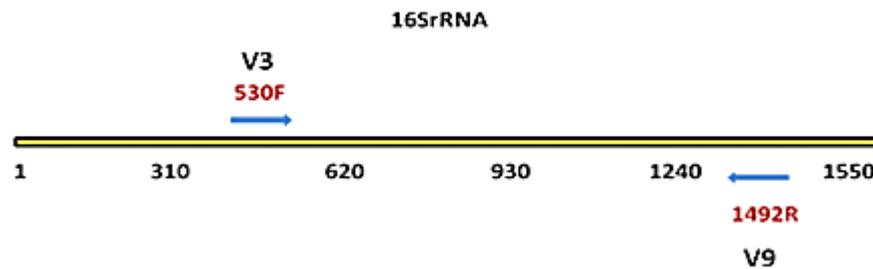


Figura 5. Esquema da localização aproximada do anelamento dos iniciadores 530F e 1492R (Borneman e Triplett 1997), de acordo com o tamanho do gene 16S rRNA (Clarridge, 2004).

4.3.5. Análises das sequências de DNA das salmonelas isoladas

As sequências obtidas foram processadas para remoção de sequências de baixa qualidade utilizando o programa “Phred/Phrap”. Cada sequencia foi comparada com sequências depositada no “Genebank” (NCBI), BLAST do “National Center for Biotechnology Information”.

4.3.6. Perfil dos genes de virulência presentes nas salmonelas

Para detectar os genes de virulência presentes nas salmonelas, foram testadas várias temperaturas de anelamento, concentrações de reagentes e incorporação progressiva dos oligonucleotídeos, utilizando 1 par de *primer* para cada gene. Os genes de virulência estudados, seus respectivos *primers* e tamanhos estão descritos na tabela 3. Os fragmentos obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em cubas horizontais, a 80V, em tampão TBE. Em cada poço do gel foram aplicados 10µL do produto da reação da

PCR, juntamente com 2µL do tampão de ressuspensão 2X. O gel foi corado em solução de brometo de etídio e visualizado em transiluminador, de acordo com método de Biao Suo *et al* (2010).

Tabela 3. Genes e *primers* para detecção de virulência de *Salmonella enterica*.

Gene	Primer	Tam. (pb)	Referência
<i>InvA</i>	invA01F-ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT/ invA02R-AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT	244	Chiu & Ou, 1996
<i>fimA</i>	fimA01F AGC GTG AGT GGC GGT ACT A/ fimA02R GCA GCG TAT TGG TGC CTT C	385	Carneiro <i>et al</i> , 2009
<i>agfA</i>	agfA01F- CCG GCC CGG ACT CAA CG/ agfA02R- CCG TAT TGG CCG ACA GTA A	241	Carneiro <i>et al</i> 2009
<i>fliC</i>	fliC01F CGT AAC GCT AAC GAC GGC/ fliC02R GCA TGA GTG TCG TAA CCCG	404	Carneiro <i>et al</i> , 2009
<i>spvC</i>	spvC01F- ACT CCT TGC ACA ACC AAA TGC GGA/ spvC02R- TGT CTT CTG CAT TTC GCC ACC ATCA	571	Chiu & Ou, 1996
<i>sfdA</i>	sfdA01F- ACC GAC CGC TGG GAT GGG/ sfdA02R- TAA TCG TGA TGA GCC CCA ACG	146	Carneiro <i>et al</i> , 2009
<i>phoP</i>	phoP01F- ATG CAA AGC CCG ACC ATG ACG/ phoP02R- GTA TCG ACC ACC ACG ATG GTT	299	Miller, Kukral & Mekalanos, 1989
<i>slyA</i>	slyA01F- GCC AAA ACT GAA GCT ACA GGT G/ slyA02R- CGG CAG GTC AGC GTG TCG TGC	700	Soto <i>et al</i> , 2000
<i>aceK</i>	aceK01F – CCGCGCTGGTTGAGTGG aceK02R – GCGGGGCGAATTTGTCTTTA	240	O'Regan <i>et al</i> , 2008

4.3.7. Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Um subgrupo de amostras de *Salmonella* foram selecionadas de acordo com sua região de procedência e analisadas quanto ao perfil de similaridade genética pelo método de eletroforese em gel de agarose em campo pulsado. Essa técnica permitiu fazer o processo de separação das moléculas de DNA pela sua carga elétrica, através da enzima de corte XbaI, formando as bandas que reuniu fragmentos semelhantes e permitiu observar a variabilidade genética entre os isolados identificados nestes estudo. Esse procedimento foi realizado segundo a metodologia padronizada pelo *Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta,

GO/USA, disponível no programa PulseNet, seguindo os parâmetros abaixo (Tabela 4) (RIBOT *et al*, 2009).

Tabela 4. Parâmetros da corrida eletroforética do Pulsed Field na câmara CHEF DR-III.

DNA (kb)	100 a 2000
% Agarose	1,2
TAE(X)	1,0
Voltagem	6 V
Ângulo	120°
Tempo inicial	5s
Tempo de mudança final	35s
Tempo de corrida	20h

4.4. Tratamento e análise dos dados

Os resultados dos exames bacteriológicos foram inicialmente organizados em planilhas Excel para posterior análises e testes estatísticos.

Após a tipagem dos fatores de virulência dos 22 isolados de *Salmonella* (9 de amostras clínicas e 13 de amostras selvagens), foi realizada uma análise de correspondência que consiste na exploração da associação entre os 22 isolados e os 9 fatores de virulência testados. Para isto, foi construída uma tabela de contingência de dupla entrada (9 colunas correspondentes aos fatores de virulência e 22 linhas correspondentes aos isolados) para visualizar associações através das distribuições geográficas das duas variáveis (isolados e virulências) no gráfico. Foi utilizado o software estatístico R (versão 2.15.2) com pacote chamado CA, com o qual as variáveis (isolados e virulência) são distribuídas geograficamente em um gráfico, permitindo observar as associações existentes entre eles. A interpretação dessas associações será observada como associações forte, média e baixa.

Os perfis das salmonelas encontrados pela técnica Pulsed Field Gel Electrophoresis foram analisados e comparados pelo programa BioNumerics versão 6.5, com coeficiente de similaridade de Dice, tolerância 1% e formação do Cluster por UPGMA.

5. Resultados

5.1. Origem e identificação das cepas de *Salmonella*

Neste estudo foram utilizadas 22 cepas de *Salmonella* isoladas de amostras clínicas e ambientais. Dentre estas, 9 cepas (4,5%) foram isoladas da análise de 200 amostras fecais de crianças com diarreia, atendidas em dois Prontos socorros infantis na cidade de Manaus/AM e 4 cepas (1,4%) isoladas de 282 amostras fecais de adultos e crianças, 4 cepas (3%) isoladas de 133 amostras de fezes de animais e 5 cepas (8,8%) isoladas de 57 amostras de água, que foram coletadas na comunidade rural de Rio Pardo/AM.

Todas as cepas foram isoladas e caracterizadas através de meios seletivos, testes bioquímicos e identificadas geneticamente pela amplificação e sequenciamento do gene 16S rRNA.

Para o isolamento e caracterização fenotípica das cepas, foi selecionada uma colônia de cada meio seletivo, lactose negativa. Estas colônias selecionadas, foram inoculadas em meios bioquímicos EPM, MILi e Citrato de Simons (CS) (Figura 6). A identificação através das provas bioquímicas foi realizada através da tabela de leitura padronizada pela Probac do Brasil (Tabela 5). Podemos observar na figura 6 as diferenças bioquímicas entre duas das salmonelas isoladas e uma *Shigella* sp.. As salmonelas se diferenciam da *Shigella* por apresentarem como principais características, a produção de H₂S, gás, motilidade, lisina e citrato, este último pode ser negativo quando se trata de uma *Salmonella* Paratyphi, diferentes de *Shigella* sp. (Figura 6C) que apresentam todas essas características negativas.

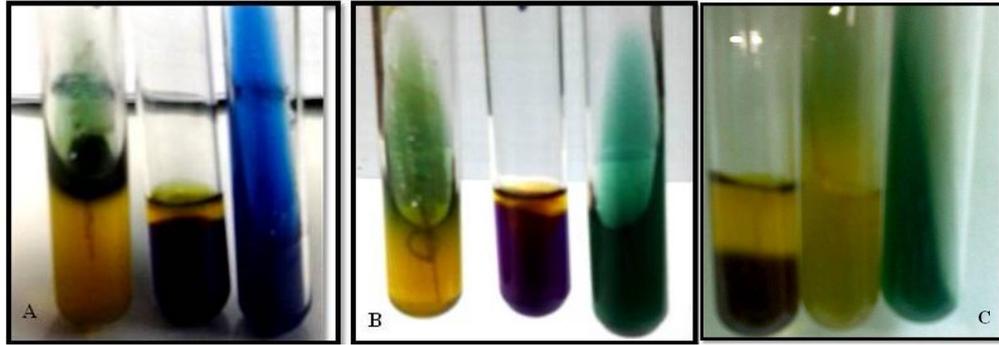


Figura 6. Meios bioquímicos EPM, MILI, CS com cultura bacteriana. (esquerda para direita).
A- *Salmonella* sp.; B- *S. Paratyphi*; C- *Shigella* sp. (Fonte: Santa-Rita, A.M.; Takita, P.)

Na tabela 5 podemos observar as características bioquímicas resultantes do processo metabólico das cepas isoladas nos testes bioquímicos. Essa tabela é utilizada para identificação clássica das enterobactérias, além da leitura da fermentação da lactose obtida pelo crescimento da colônia em placa. Observar-se nas amostras com círculo vermelho (Tabela 5) que cinco colônias dentre os 22 isolados não puderam ser identificadas pela metodologia clássica, pois possuíam características bioquímicas diferentes das características que classificam as salmonelas. Estas cinco colônias não apresentaram produção de gás e nem motilidade, que são características comuns entre a maioria dos sorovares de *Salmonella*, além da urease positiva apresentada por quatro destas cinco cepas, característica que não é comum ao gênero. Porém em meio seletivo estas amostras possuíam as mesmas características morfológicas das cepas que foram caracterizadas como *Salmonella*. Por isso, resolvemos não descartar estas 5 amostras.

Tabela 5. Resultado da leitura do teste bioquímico das 22 cepas de *Salmonella* utilizadas neste estudo, de acordo com a tabela de identificação da Probac do Brasil.

Nº	Registro	Amostra biológica	Meio/Col	LAC	GÁS	H ₂ S	URE	TDA	MOT	INDOL	LIS	CIT	Identificação Probac
1S	32DZS	Diarreia	MC col 2	-	+	-	-	-	+	-	+	+	213 <i>S. Choleraesius</i>
2S	33DZS	Diarreia	MC col 6	-	+	-	-	-	+	-	+	+	213 <i>S. Choleraesius</i>
3S	77DZS	Diarreia	HEK	-	-	+	+	-	-	-	+	+	143 s/Id.
4S	142DZS	Diarreia	XLD	-	-	+	-	-	+	-	+	+	113 <i>Salmonella</i> spp.
5S	143DZS	Diarreia	SS col 2	-	-	+	-	-	+	-	+	+	113 <i>Salmonella</i> spp.
6S	36DZL	Diarreia	HEK	-	-	+	-	-	+	-	+	+	113 <i>Salmonella</i> spp.
7S	37DZL	Diarreia	SS	-	-	+	-	-	+	-	+	+	113 <i>Salmonella</i> spp.
8S	38DZL	Diarreia	XLD	-	-	+	-	-	+	-	+	+	113 <i>Salmonella</i> spp.
9S	40DZL	Diarreia	HEK	-	-	+	-	-	+	-	+	+	113 <i>Salmonella</i> spp.
10S	C158P1046	Pessoa – RP	VB (R) col 3	-	-	+	-	-	+	-	+	+	113 <i>Salmonella</i> spp.
11S	C71P301	Pessoa – RP	HEK col 7	-	+	-	-	-	+	-	-	-	210 <i>S. Paratyphi</i> A
12S	C64P237	Pessoa – RP	VB col 1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	210 <i>S. Paratyphi</i> A
13S	C45P173	Pessoa – RP	VB (R) col 6	-	+	-	-	-	+	-	-	-	210 <i>S. Paratyphi</i> A
14S	C76A3	Animal – RP	SS (M) col 9	-	+	-	-	-	+	-	-	-	210 <i>S. Paratyphi</i> A
15S	C65A3	Animal – RP	HEK col 6	-	-	+	+	-	-	-	+	+	143 s/Id.
16S	C126A3	Animal – RP	HEK col 3	-	-	+	+	-	-	-	-	-	140 s/Id.
17S	C164A1	Animal – RP	SS col 9	-	-	+	+	-	-	-	+	+	143 s/Id.
18S	4H2O	Água – RP	PIA (B)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	210 <i>S. Paratyphi</i> A
19S	9H2O	Água – RP	PIA (B)	-	+	-	-	-	+	-	+	+	213 <i>S. Choleraesius</i>
20S	22H2O	Água – RP	MC(RB) colA	-	+	-	-	-	+	-	-	-	210 <i>S. Paratyphi</i> A
21S	29H2O	Água – RP	MC (R) col C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	001 s/Id.
22S	56H2O	Água - RP	MC (R)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	210 <i>S. Paratyphi</i> A

LAC – lactose; H₂S – gás sulfídrico; URE – uréase; TDA – triptofano desaminase; MOT – motilidade; LIS – lisina; CIT – citrato.

5.2. Identificação molecular

Para elucidar se as cinco colônias não identificadas por metodologia clássica se tratavam de salmonelas, utilizamos a técnica de identificação molecular pelo sequenciamento das bases nitrogenadas, utilizando os gene 16s rRNA. Para isto, foi feito a extração do DNA e amplificação do gene 16s por PCR de cada uma das cepas bacterianas isoladas e identificadas pelas provas bioquímicas, como está fotodocumentado nas figuras 7A e 7B, respectivamente.

As sequências obtidas foram comparadas em banco de dados do *GenBank*, onde o índice de confiança para identidade bacteriana ficou acima de 80% e após a confirmação da espécie, estas sequências foram depositadas neste mesmo banco de dados, através do ID 1651208 (Anexo 5). Neste anexo pode-se comprovar que todas as cepas foram confirmadas como *Salmonella*, inclusive as cinco cepas não identificadas pelo teste bioquímico.

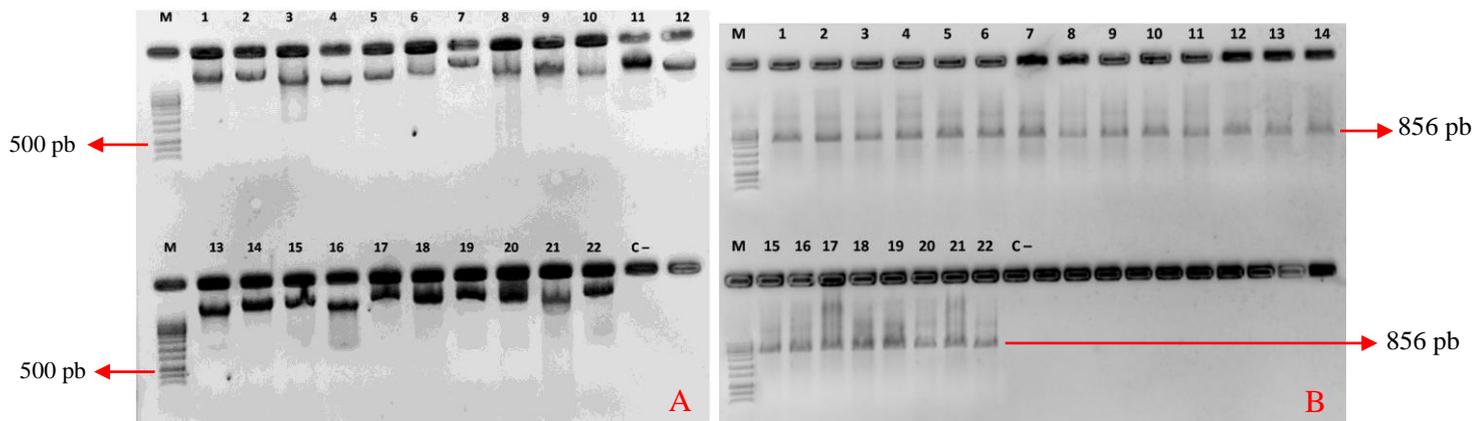


Figura 7. A- Gel da extração do DNA das 22 cepas de salmonelas isoladas; Agarose 1% TBE. Superior: Poço M: Marcador 100pb Invitrogen; Poços 1 a 12: salmonelas; Inferior: Poço M: Marcador 100pb Invitrogen; Poços 13 a 22: salmonelas; Poço C-: Controle negativo da reação; B- Amplificação do gene 16s das cepas por PCR; Agarose 1% TBE. Superior: Poço M: Marcador 100pb da Invitrogen; Poços 1 a 14: amplicons das salmonelas; Inferior: Poço M: Marcador 100pb da Invitrogen; Poços 15 a 22: amplicons das salmonelas; Poço C-: Controle negativo da reação.

5.3. Distribuição epidemiológica das cepas isoladas

Nas 200 amostras de casos clínicos foram isoladas e identificadas por sequenciamento 9 salmonelas, sendo 7 (77%) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* e 2 (23%) *Salmonella enterica* subsp. *arizonae*. Entre os sorovares da subespécie *S. enterica*, o mais frequente foi *S.*

Paratyphi B, 3 (42%). A distribuição espacial destas cepas foi analisada através do questionário sócio epidemiológico, baseado no local de residência das crianças (Figura 8).

O crescimento populacional levou a intensa urbanização desordenada da cidade de Manaus. Dentre os novos bairros criados, duas zonas geográficas participantes desta pesquisa podem ser citados: Zona Sul (bairros da Cachoeirinha, Petrópolis e Raiz) e Zona Leste (bairros Alfredo Nascimento, Tancredo Neves e João Paulo). Estas zonas geográficas ainda apresentam carência no abastecimento de água e no recolhimento de lixos, resíduos e serviços básicos em saúde, fatores agravantes para qualidade de vida da população (Figura 8).

Estes fatores têm relação direta com o aparecimento de casos de diarreia em crianças e adultos residentes nestes bairros, devido à efetiva contaminação pela rota fecal-oral. Além disso, o fato de muitas residências se localizarem próximas aos igarapés favorece a contaminação por bactérias e outros patógenos que têm a água como principal veículo de transmissão. De acordo com as informações obtidas através do questionário epidemiológico, 6 (70%) das residências onde as crianças participantes deste estudo moram, bebem e fazem uso da água encanada e 3 (30%) utilizam água mineral. As condições precárias de moradia acabam favorecendo a contaminação por patógenos intestinais, justificando o quadro por salmonelas encontradas neste estudo.

Das 62 amostras de Controles (crianças sem diarreia) coletadas e analisadas junto com as amostras clínicas (Casos), nenhuma *Salmonella* foi isolada e identificada, sendo assim, essas crianças não são portadoras assintomáticas de *Salmonella*, mas, apresentaram outros patógenos na microbiota intestinal.

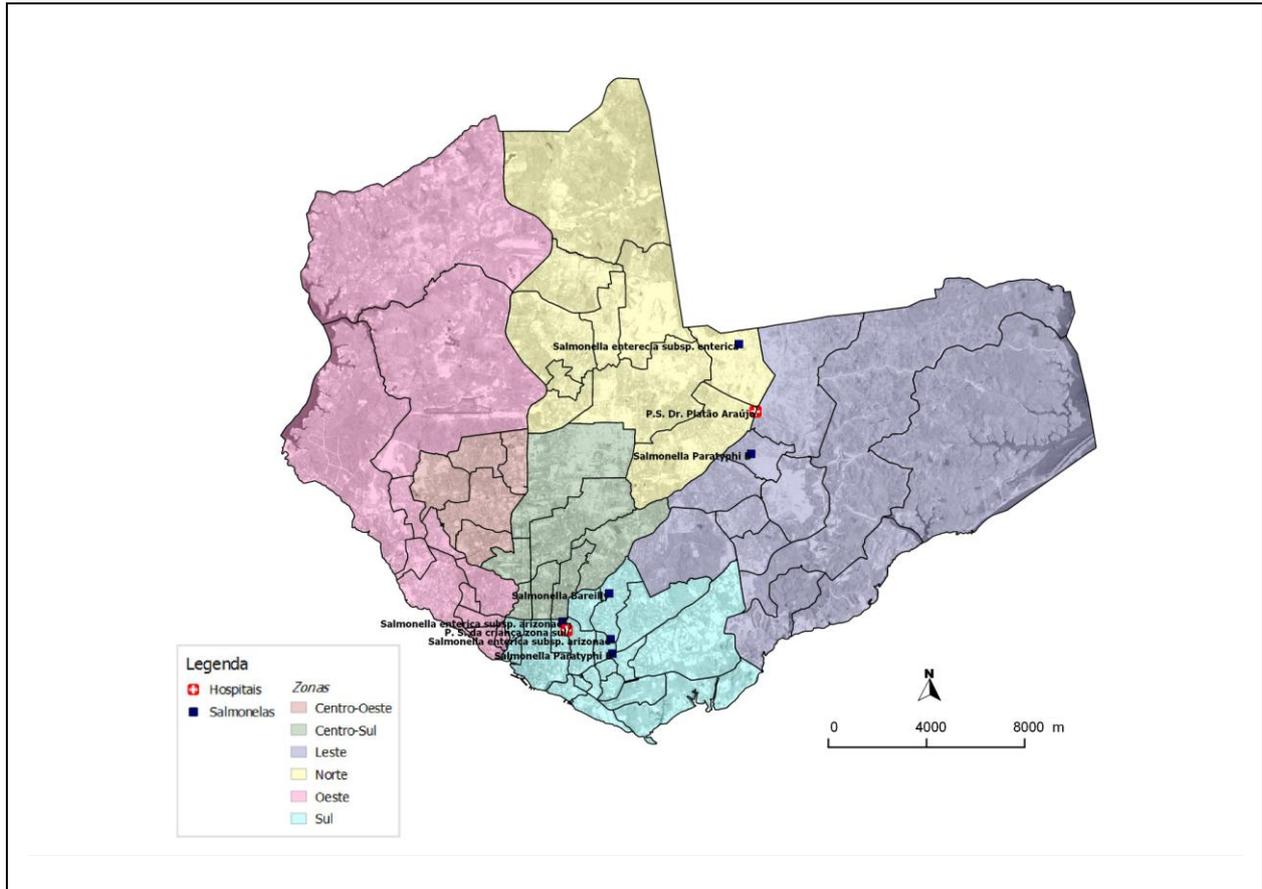


Figura 8: Distribuição das salmonelas encontradas nas amostras clínicas em Manaus/AM. (Fonte: Fonseca, F.R.; Grupo de apoio a pesquisa do ILM).)

Com relação às amostras isoladas na Comunidade Rio Pardo/AM, 4 foram isoladas das amostras fecais de pessoas, 4 de fezes de animais e 5 das amostras de água, identificados com ícones na figura 9. Destas, 8 (61,6%) pertencentes a subespécie *enterica*, 1 (7,6%) subespécie *arizonae* e 4 (30,8 %) foram identificadas somente ao nível de gênero, *Salmonella* sp. O sorovar *S. Javiana* foi o mais frequente 3 (30%) dentre os sorovares da espécie *enterica*, seguido de *S. Typhimurium* 2 (20%). Estes isolados estão identificados na figura 9 pelos seus respectivos desenhos (Pessoa = ; Animal = galinha , cachorro ; Água= .

Das amostras fecais de pessoas, 2 foram isoladas de fezes de crianças, residentes de uma casa do ramal Samuel e de outra casa as margens do Igarapé Rio Pardo, 2 de fezes de adultos, residentes de uma casa do ramal Samuel e de outra casa no ramal Novo Paraíso. Dentre estas pessoas, todos relataram não ter o hábito de lavar as mãos ao saírem do banheiro.

Uma criança e um adulto relataram que tiveram diarreia sete dias antes da coleta, sendo que este adulto não informou a fonte de água que consome. Três consomem água de cacimba tratada com hipoclorito.

Foram isoladas 4 cepas de amostras fecais de animais, sendo 3 de galinhas e 1 de cachorro, sendo que 2 dos isolados de fezes de galinhas são de duas residências próximas que ficam no ramal Samuel e que utilizam água de cacimba para consumo e utilidades domésticas, 1 de uma residência do ramal Principal e o isolado de amostra fecal de cachorro foi proveniente de uma residência que fica as margens do Igarapé Rio Pardo, estas duas últimas residências (Principal e Igarapé) utilizam água do Igarapé Rio Pardo para fins domésticos e de consumo. Responsáveis por estas quatro residências ainda relataram que o quintal é o destino final da água utilizada e uma das residências do ramal Samuel e uma do Igarapé Rio Pardo não possuem instalação sanitária.

Dentre as 5 cepas isoladas das amostras da água, 3 foram de cacimbas dos ramais Gusmão (2) e Principal (1), 1 do Igarapé Rio Pardo e 1 do Rio Canoas.

Na figura 9 se observa a distribuição espacial de todas as 13 salmonelas ambientais provenientes da comunidade rural Rio Pardo/AM, de acordo com o local de moradia (ramais) e tipo de amostra (pessoas, animais e água).

Dentre os seis ramais de terra e um igarapé que representam a comunidade Rio Pardo, o local que apresentou maior número de *Salmonella* sp. isoladas e identificadas foi o ramal Samuel 4 (30%), no qual reside a maior parte da população desta comunidade, como pode ser observado na figura 9.

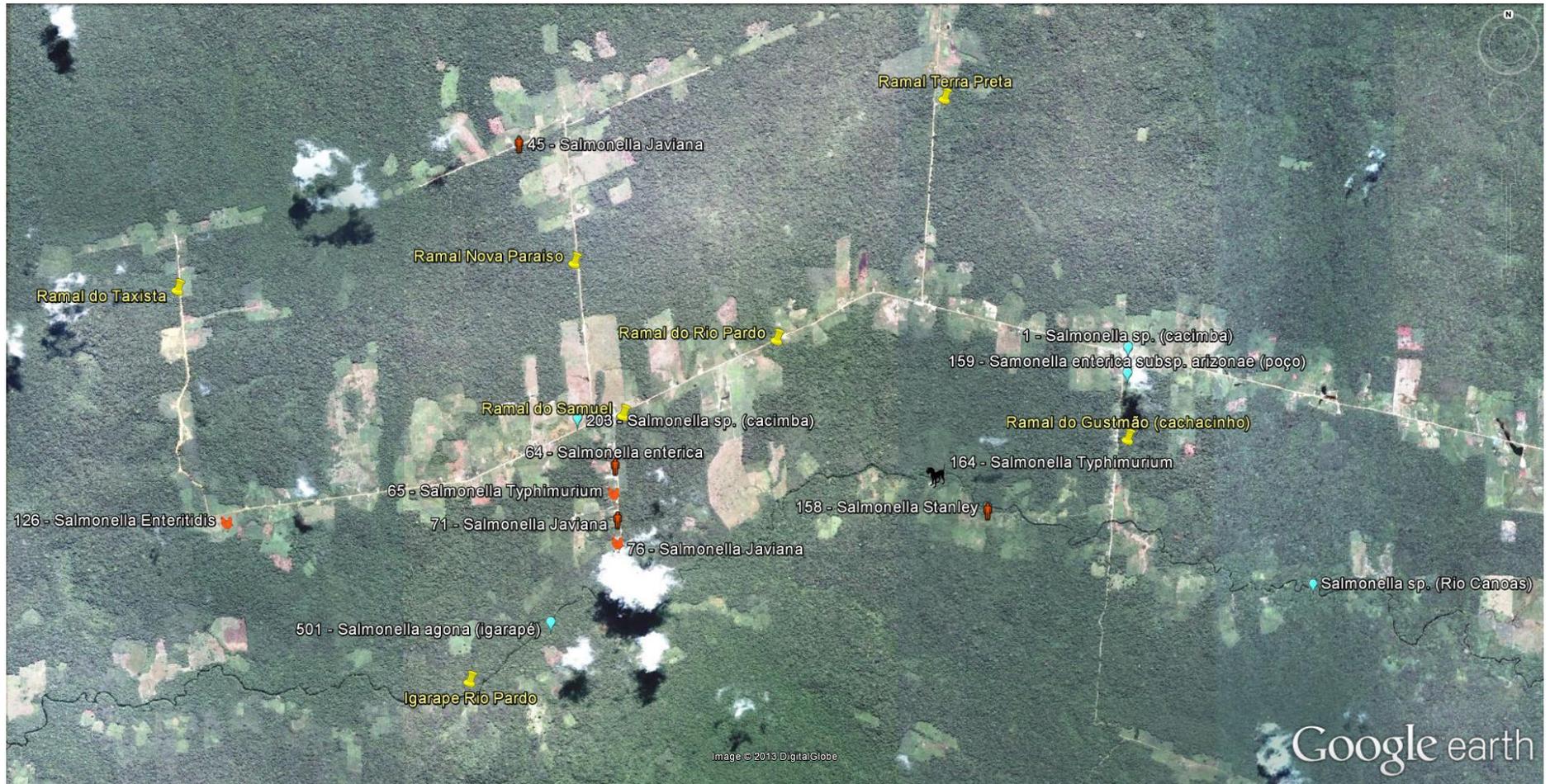


Figura 9. Distribuição espacial dos isolados ambientais, Rio Pardo/AM. (Fonte: Fonseca, F.R.; Grupo de apoio a pesquisa do ILMD).

5.4. Perfil de resistência dos isolados aos antimicrobiano

As vinte e duas salmonelas isoladas e identificadas foram testadas quanto à resistência aos seguintes antimicrobianos: ácido nalidixico – NAL (30 µg), amicacina – AMI (30 µg), amoxicilina + ácido clavulânico – AMC (20/10 µg), aztreonam – ATM (30 µg), ciprofloxacina – CIP (5 µg), cloranfenicol – CLO (30 µg), gentamicina – GEN (10 µg), nitrofurantoina – NIT (300 µg), norfloxacina – NOR (10 µg), piperacilina + tazobactam – PPT (110 µg) e sulfametaxazol + trimetropima – SUT (23,75/1,25 µg).

Na figura 10 está representado o perfil de resistência das salmonelas isoladas das amostras clínicas aos onze antibióticos testados. *S. Paratyphi B* (8S e 9S) e *S. Bareilly* (4S) foram 100% sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Dentre os onze antimicrobianos, aztreonam, ciprofloxacina, norfloxacina e piperacilina + tazobactam apresentaram os melhores resultados de inibição do crescimento bacteriano (36%). *S. enterica* subsp. *arizonae* (1S e 2S) foi resistente ao antibiótico amoxicilina + ác. clavulânico, mas o isolado 2S também apresentou perfil intermediário ao ácido nalidixico. *S. enterica* subsp. *enterica* (6S) foi o único isolado que apresentou resistência a cinco dos antimicrobianos testados, inclusive ao cloranfenicol, sulfametaxazol + trimetropima e gentamicina, antibióticos comumente administrados em casos de diarreia por esse tipo de patógeno, como pode ser observado na figura abaixo.

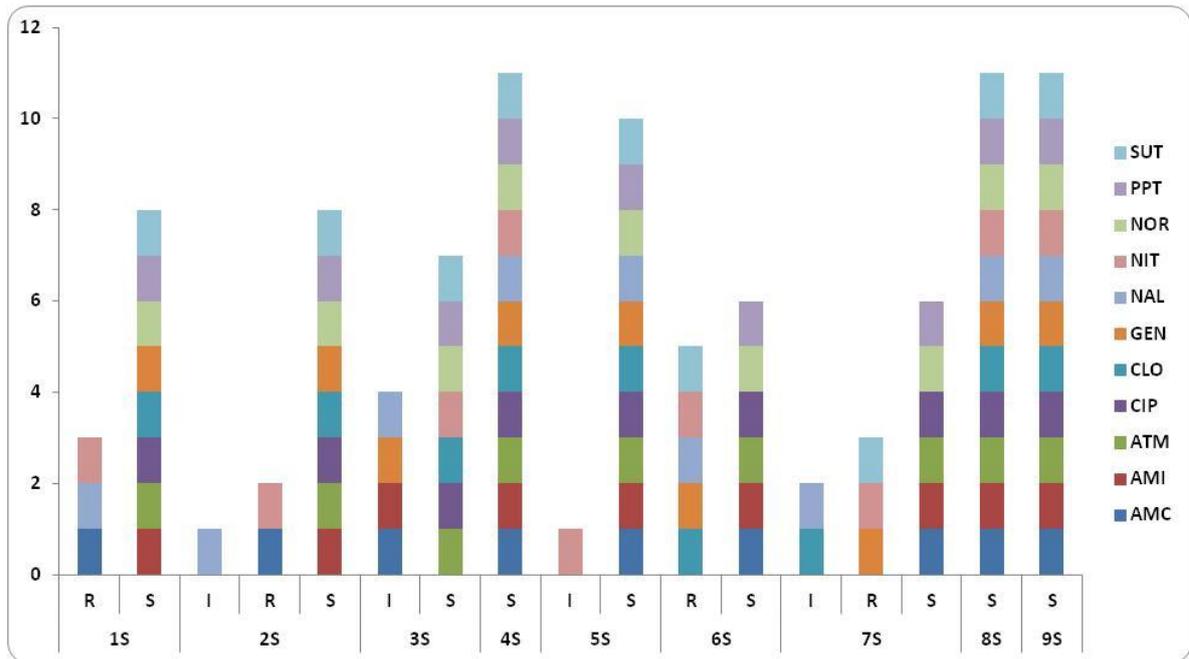


Figura 10: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das salmonelas isoladas dos casos clínicos em Manaus. S: sensível; I: intermediário; R: resistente.

Nas salmonelas isoladas de pessoas, animais e da água em Rio Pardo/AM (Tabela 5), o perfil de sensibilidade foi bastante diversificado. Dentre os antimicrobianos testados, todos os isolados foram sensíveis ao antibiótico ciprofloxacina 13 (100%), alguns isolados a aztreonam e piperacilina + tazobactam 12 (92%) e outros a amicacina, ác. nalidixico e norfloxacina 11 (85%). Os isolados 17S e 18S apresentaram perfis idênticos e foram resistentes a gentamicina. Alguns isolados foram resistentes aos antimicrobianos amoxicilina + ác. clavulânico (10S, 11S, 13S e 22S), nitrofurantoina e gentamicina (10S e 12S). Dentre os demais isolados que apresentaram perfil de resistência, nitrofurantoina e sulfametaxazol + trimetropima 6 (46%) e gentamicina 4 (30%) foram os antibióticos mais frequentes (Figura 11).

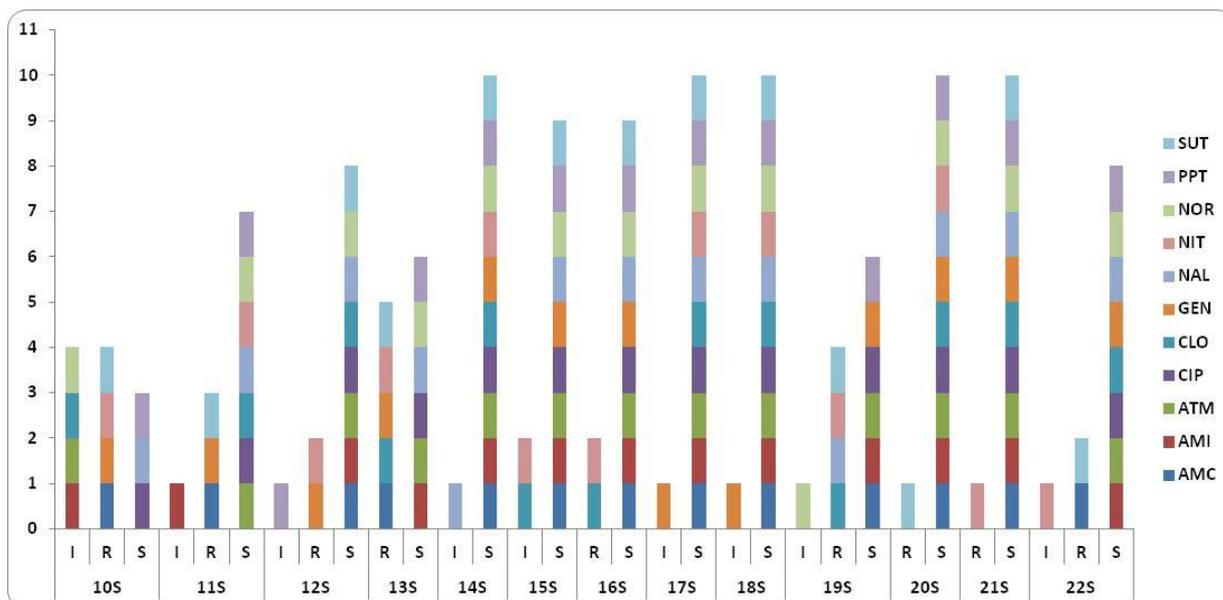


Figura 11: Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados selvagens de Rio Pardo.
S: sensível; I: intermediário; R: resistente

5.5. Perfil dos genes de virulência das salmonelas isoladas

Foram testados nove genes para analisar o perfil de virulência nas salmonelas isoladas, suas características e funções estão descritos na tabela 2 e sua amplificação padrão na figura 12. Para os testes dessas virulências utilizou-se a técnica de PCR, realizada em triplicata para confirmação de resultados. A presença e ausência desses fatores de virulências nos 22 isolados, está descrito na tabela 6.

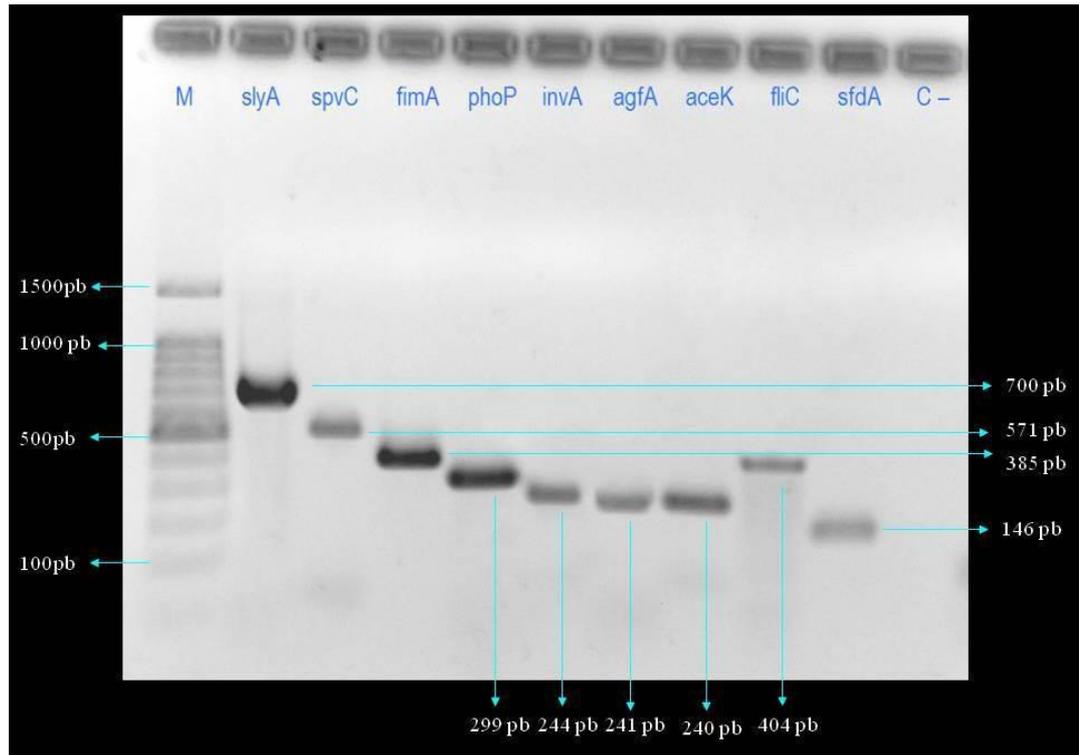


Figura 12. Padrão da amplificação dos genes de virulência utilizados. Gel de Agarose 1%. 110V TBE. Poço 1 - Ladder 100pb, Ludwing; Poços 2 a 10 – amplicons dos diferentes genes testados; Poço 11 – Controle negativo da reação.

Foi realizada uma análise de correspondência simples para exploração de associações entre os 22 isolados e os 9 fatores de virulência. Na Figura 13, quanto mais próximos os isolados dos fatores de virulências, mais forte foi a associação e, quanto mais distante, menos relacionados estão estas variáveis. A distribuição das variáveis no mapa foi obtido pelo resultado binário (positivo ou negativo) da amplificação dos genes por PCR, como está representado na figura 13.

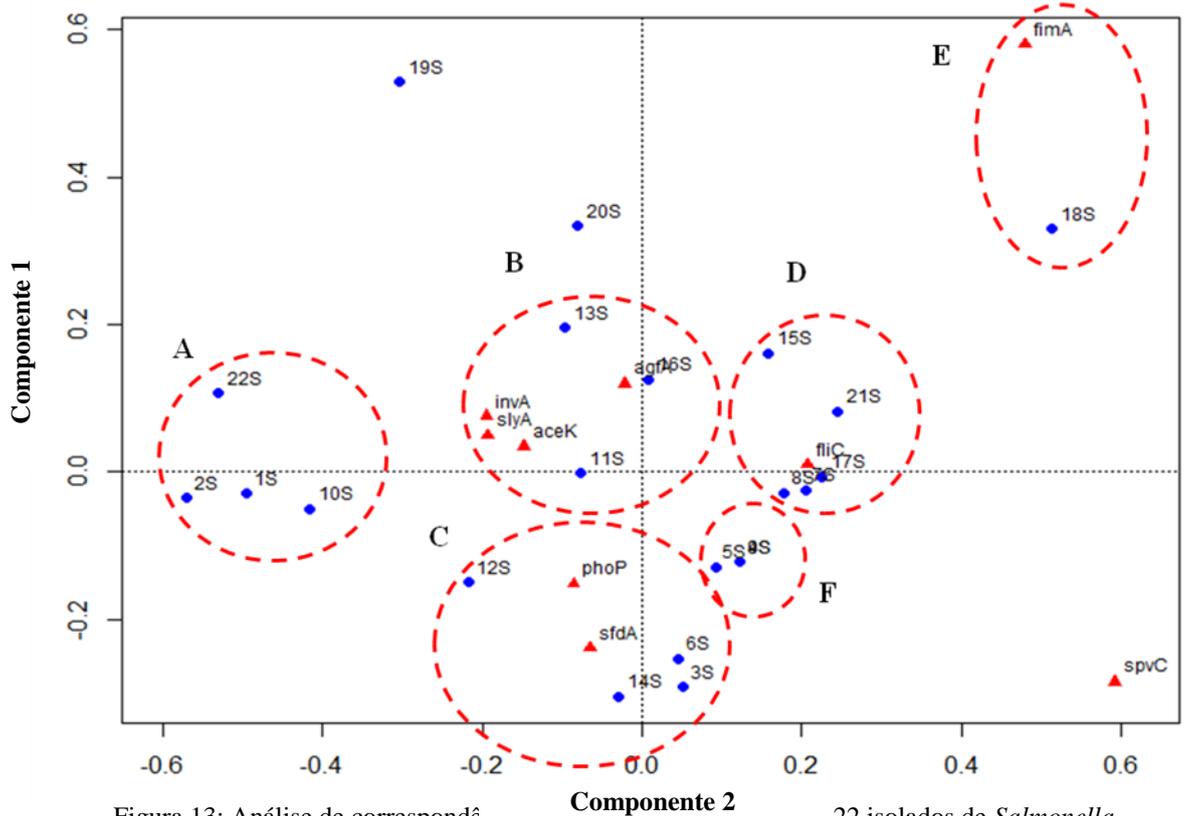


Figura 13: Análise de correspondência de 22 isolados de *Salmonella*.
 ▲ = virulências ● = salmonelas.

A partir da distribuição dos isolados na Figura 13 observa-se que a maioria dos isolados selvagens (11S, 13S, 15S, 16S, 17S, 18S, 19S, 20S, 21S e 22S) ficou distribuída na área superior da figura, enquanto que os outros selvagens (10S, 12S e 14S) ficaram abaixo. Nota-se que todos os isolados clínicos (1S-9S) ficaram na parte inferior do mapa.

Em relação às possíveis associações entre os fatores de virulência e os isolados, os grupos de associações foram destacados em forma de círculo (A, B, C, D e E, Figura 13). Embora dois isolados clínicos (1S e 2S) e dois selvagens (10S e 22S) do grupo A, apresentassem positividade em alguns fatores de virulência (Quadro 2) eles ficaram destacados por não ter associação forte com nenhum desses fatores.

No grupo B, alguns genes de virulência com funções importantes na aderência, invasão e sobrevivência da *Salmonella* (*invA*, *slyA*, *aceK* e *agfA*) foram presentes em todos os isolados (Quadro 2) e ficaram reunidos próximo a intersecção do eixo zero indicando uma

associação forte entre eles. Os isolados selvagens (11S, 13S e 16S) ficaram distribuídos dentro do grupo B, e o isolado 11S por estar sobre o pontilhado do eixo zero horizontal carrega mais esta associação forte. Vale destacar que o isolado 11S não apresentou os fatores *fimA* (grupo E) e *spvC* (Quadro 2) que ficaram distribuídos no gráfico nas extremidades superior e inferior, respectivamente.

Os grupos C e D apresentaram características de associação com alguns fatores de virulência, pois estão localizados na região próxima ao eixo zero vertical e horizontal respectivamente. Em relação ao grupo C, os genes *phoP* e *sfdA* apresentaram forte associação com os isolados selvagens (12S e 14S) e dois clínicos (3S e 6S). No grupo D, o gene *fliC* formou forte associação com os isolados clínicos (7S, 8S) e selvagens (15S, 17S e 21S). Um grupo formado com os isolados clínicos 4S, 5S e 9S ficou distribuído entre os grupos C e D, apresentando média associação com os fatores de virulência contidos nestes grupos e ficaram destacados no grupo F.

Os isolados 19S e 20S, localizados no quadrante superior esquerdo, não se associaram a nenhum dos 9 fatores de virulência testados e o isolado 18 também ficou afastado, mas, foi o único que apresentou tendência a ter associação com o gene de virulência *fimA* (grupo E).

As associações evidenciadas pela análise de distribuição indicaram que não existe uma distinção clara entre isolado de *Salmonella* ser origem clínica ou selvagem.

Quadro 2: Isolados de *Salmonella* de amostras diarreicas e não diarreicas, de acordo com a positividade e negatividade das virulências e associação com os sintomas.

Cód.	Amostras	Isolados/ Genes	aceK	agfA	fimA	fliC	phoP	sfdA	slyA	spvC	invA
1S	FD	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	FVD								
2S	FD	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>									
3S	FD	<i>Salmonella</i> Paratyphi B	F	F	F	F	F	F	F	F	F
4S	FD	<i>Salmonella</i> Bareilly	FV								
5S	FD	<i>Salmonella</i> Bareilly	FV								
6S	FD	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	FV Sv								
7S	FD	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	FV Sv								
8S	FD	<i>Salmonella</i> Paratyphi B	FSv								
9S	FD	<i>Salmonella</i> Paratyphi B	FSv								
10S	FnD	<i>Salmonella</i> Stanley									
11S	FnD	<i>Salmonella</i> Javiana									
12S	FnD	<i>Salmonella</i> sp.									
13S	FnD	<i>Salmonella</i> Javiana									
14S	FnD	<i>Salmonella</i> Javiana									
15S	FnD	<i>Salmonella</i> Typhimurium									
16S	FnD	<i>Salmonella</i> Enteritidis									
17S	FnD	<i>Salmonella</i> Typhimurium									
18S	H ₂ O	<i>Salmonella</i> sp.									
19S	H ₂ O	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>									
20S	H ₂ O	<i>Salmonella</i> sp.									
21S	H ₂ O	<i>Salmonella</i> Agona									
22S	H ₂ O	<i>Salmonella</i> sp.									

Caselas em laranja = virulência positiva; Caselas em branco = virulência negativa; FD = fezes diarreicas (1S a 9S); FnD = fezes não diarreicas (10S a 22S); Isolados marcados com traço em vermelho foram associados a sintomatologia das crianças (F = febre; V = vômito; Sv = sangue visível); Cód. = código.

5.5.1. Sintomatologia das crianças com diarreia e as virulências dos isolados

Os fatores de virulência foram relacionados com a sintomatologia que as crianças com diarreia apresentaram no momento da coleta das amostras (Quadro 2). Foram analisadas amostras de fezes de 9 crianças, dentre estas 5 (60%) foram de meninas e 4 (40%) foram de meninos, com idades entre três meses e dois anos.

De acordo com o Ministério da Saúde e Centro de Controle e Prevenção de Doenças, os sintomas mais comuns manifestados por pessoas com casos de diarreia infecciosa são vômito, febre, desidratação e sangue nas fezes. (CDC, 2005). Os isolados de *Salmonella* das crianças que estavam com diarreia e apresentaram estes sintomas foram relacionados aos seus fatores de virulência, como se observa na figura 14 e quadro 2.

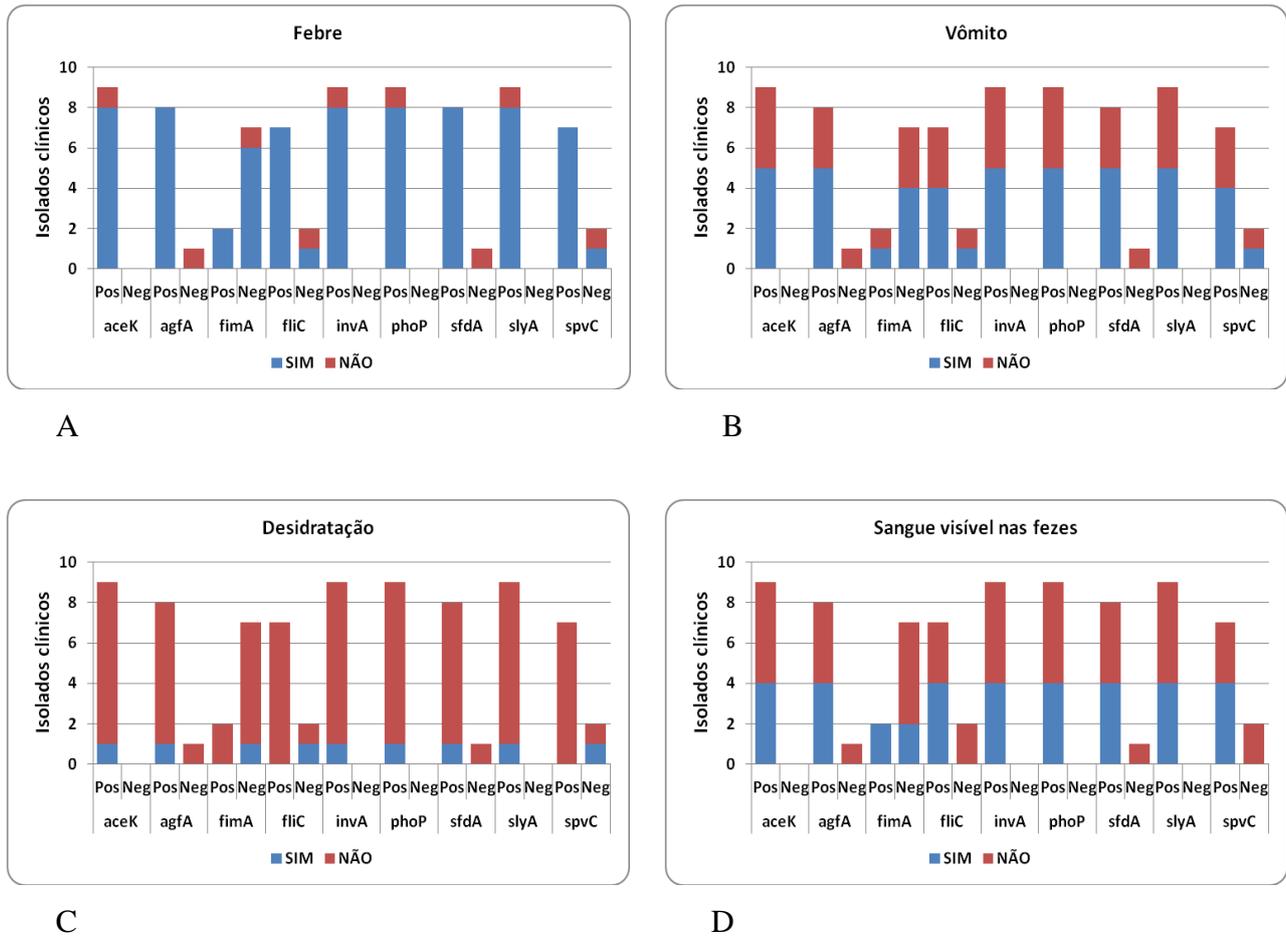


Figura 14: Relação dos genes de virulência com a sintomatologia das crianças com diarreia (Casos). Eixo Y= isolados de casos clínicos; Eixo X= Fatores de virulências = Pos e Neg; Presença de sintomas = Sim ou Não.

Dentre os quatro sintomas: febre, vômito, desidratação e sangue nas fezes pesquisados nas crianças com diarreia, os mais frequentes foram febre e vômito, apenas uma criança não estava com febre no momento da coleta (Figura 14 A e B).

Os fatores de virulência *aceK*, *invA*, *phoP* e *slyA* apresentaram perfil positivo em todas as cepas de *Salmonella* clínica (Figura 14 A-D). Analisando a figura do sintoma febre (Figura

14-A), uma cepa mesmo com positividade para as virulências *aceK*, *invA*, *phoP* e *slyA*, não parece ter relação com este sintoma. Os genes *fliC* e *spvC* apresentaram perfis idênticos, uma cepa que tem virulência negativa apresentou o sintoma febre (Figura 14 A).

Na relação dos fatores de virulência com o sintoma vômito e sangue visível nas fezes (Figuras 14- B e D), os genes *fliC* e *spvC*, *agfA* e *sfDA* formaram perfis heterogêneos, não sendo possível associá-los a estes sintomas.

No perfil do sintoma desidratação, a maioria das cepas apresentou-se positivas para os fatores de virulência testados, porém devido à ausência deste sintoma nos pacientes, sugerimos que estas virulências não possuem associação com a desidratação (Figura 14 C).

Nos quatro sintomas analisados, pelo menos 1 dos isolados não possuem os genes de virulência *agfA* e *sfDA*. Os genes de virulência *aceK*, *invA*, *phoP* e *slyA* são positivamente virulentos em todos os isolados e apresentaram perfis idênticos em relação a cada sintoma analisado. O gene *fimA* foi o único que apresentou um perfil diferente dos demais, sete dos 22 isolados não apresentaram este gene (Figura 14).

5.6. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Análise por PFGE obtido pela enzima de restrição XbaI revelou ampla diversidade nos perfis gerados pelos isolados, compartilhando similaridade genética entre 40% e 100% (Figura 15). Para análise dos perfis gerados pelos isolados clínicos e melhor interpretação, foi feita uma identificação para cada criança de onde se isolou *Salmonella* sp., utilizando informações obtidas através do questionário epidemiológico (Quadro 3).

Quadro 3: Dados epidemiológicos das crianças atendidas nos hospitais de coleta deste estudo.

Isolados	Criança	Sexo	Idade	Bairros	Hospitais
1S	C-AJ	F	2 anos	Cachoeirinha	P.S. da criança Zona Sul
2S	C-ES	F	3 meses	Petrópolis	P.S. da criança Zona Sul
3S	C-PJ	M	6 meses	Raiz	P.S. da criança Zona Sul
4S	C-AM	F	8 meses	Raiz	P. S. da criança Zona Sul
5S	C-LA	F	1 ano	Petrópolis	P.S. da criança Zona Sul
6S	C-NA	M	6 meses	Alfredo Nascimento	P.S. Dr. Platão
7S	C-AS	F	5 meses	Alfredo Nascimento	P.S. Dr. Platão
8S	C-LH	M	11 meses	Tancredo Neves	P.S. Dr. Platão
9S	C-DH	M	9 meses	João Paulo	P.S. Dr. Platão

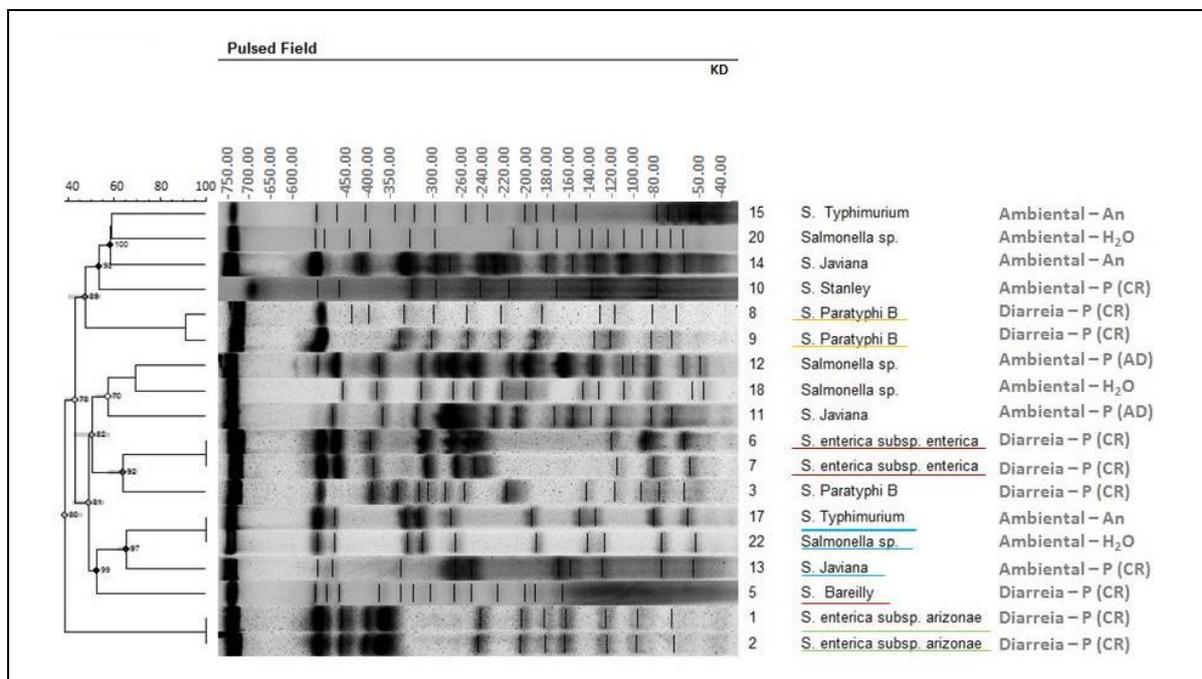


Figura 15. Perfil de similaridade das cepas de *Salmonella* clínicas e selvagens. Análise em GelCompar II, Versão 6.5, Coeficiente de Similaridade Dice, Tolerância 1%, Análise de Cluster UPGMA. P - pessoa; CR- criança; AD- adulto; An- animal; H2O - água.

Analisando os perfis gerados pelo Pulsed Field, observa-se que o isolado 1S, subespécie *arizonae*, encontrada na criança C-AJ apresentou perfil idêntico ao isolado 2S, também subespécie *arizonae*, proveniente da criança C-ES, ambas residentes da zona sul da cidade de Manaus. Outros dois isolados de amostras clínicas (6S e 7S), identificados como *S. enterica* subsp. *enterica*, isolado das crianças C-NA e C-AS, residentes no bairro Alfredo Nascimento e atendidas no Hospital Dr. Platão, também apresentaram perfis com 100% de similaridade genética (Figura 15).

Ainda analisando as amostras clínicas, o perfil gerado pelo sorovar *S. Paratyphi B* (isolados 8S e 9S), proveniente das crianças C-LH e C-DH, respectivamente, apresentaram perfil de 80% de similaridade genética. Já o isolado 3S da criança C-PJ, também identificado como *S. Paratyphi B* não formou perfil similar com os isolados 8S e 9S, ficando disposto próximo aos isolados *S. enterica* subsp. *enterica* (6S e 7S). *S. Bareilly*, isolado 5S da criança C-LA (Quadro 3), apresentou perfil diferente das demais cepas clínicas e ficou disposto próximo aos isolados selvagens (Figura 15).

Os perfis gerados pelos isolados ambientais foram diversificados. Dois isolados de origens diferentes, isolado 17S proveniente de um animal do Igarapé Rio Pardo e o isolado 22S proveniente da água do Rio Canoas, grifados em azul na Figura 15, apresentaram perfil com 100% de similaridade, ou seja, são geneticamente idênticos. *S. Javiana* (isolado 13S) possui ancestral comum aos isolados 17S e 22S, é oriundo de amostra de uma pessoa residente no ramal Samuel, próximo ao Igarapé Rio Pardo. A relação clonal entre estes isolados (13S, 17S e 22S) caracterizam a água como potencial fonte contaminante, devido a identificação de *Salmonella* sp. da água do Rio Canoas (22S), afluente do Igarapé Rio Pardo (Figura 15).

Os isolados 12S, proveniente de fezes de pessoa residente em uma casa do ramal Samuel e o 18S, proveniente de amostra da água coletada na caçimba de uma casa do ramal Gusmão, formaram perfil de 80% de similaridade genética. Na análise das informações epidemiológicas levantadas no momento da coleta, não há registro de que estes moradores compartilham a mesma fonte de água (Figura 15). *S. Javiana* (isolado 11S), proveniente da amostra de fezes de uma pessoa moradora do ramal Novo Paraíso, apresentam relação clonal com os isolados 12S e 18S (Figura 15).

Os isolados *S. Typhimurium* (15S) e *Salmonella* sp. (20S), isolados de um animal (galinha) no ramal Samuel e da água de cacimba do ramal Principal, são espécies parafiléticas

e neste mesmo grupo, compartilhando ancestral comum ficou o isolado 14S, *S. Javiana*, proveniente também da mesma espécie de animal (galinha), também do ramal Samuel. Novamente a água pode ter sido o fator indicativo pela contaminação destes animais, já que as residências de onde as amostras foram coletadas ficam próximas. De acordo com as observações no dia da coleta e informações do questionário epidemiológico aplicado, estes animais geralmente ficam dispersos nos quintais e ruelas dos ramais da comunidade. O isolado 10S, *S. Stanley*, proveniente de fezes de pessoa, moradora do Igarapé Rio Pardo (Figura 9), também possui ancestral comum aos isolados 14S, 15S e 20S (Figura 15), podendo ter como possíveis fontes contaminantes, a água do Igarapé que utiliza para consumo, fezes de animais do ramal Samuel, local onde esta pessoa (10S) frequentemente realiza visita aos seus familiares, de acordo com informações levantadas no questionário epidemiológico.

Não foi possível obter resultados para quatro das 22 cepas de *Salmonella* isoladas, sendo 1 de amostra clínica (4S) e 3 de amostras selvagens (16S, 19S e 21S) (Tabela 5). Estes isolados foram identificados no sequenciamento pelo 16S rRNA, mas, nos procedimentos de análise da similaridade genética por PFGE não formaram bandas ou faixas específicas mesmo com alterações no protocolo utilizado. Os isolados 19S e 21S (Tabela 5) não devem ter perfis conhecidos por se tratar de amostras selvagens, provenientes da água. Já o isolado 16S, isolado de fezes de animal do ramal Principal em Rio Pardo e o isolado 4S, proveniente de amostra clínica, apesar de serem frequentemente analisados por este tipo de método, devem apresentar uma variabilidade genética ainda desconhecida. Portanto, estes isolados tem que ser testados com outras enzimas de corte já que não foi possível fazer a digestão do DNA dos mesmos com a enzima XbaI utilizada neste estudo.

6. Discussão

O gênero *Salmonella* compõe bactérias que podem ser encontradas nos mais diferentes tipos de habitat, como foi descrito neste trabalho e até mesmo em ambientes com temperaturas extremas.

No presente estudo foram identificados sorovares de *Salmonella* em pessoas que não tinham sintomas de diarreia (3 sorovares), em aves (3 sorovares) e em cachorro (1 sorovar) independentes de estarem ou não com diarreia. As salmonelas são responsáveis por uma das principais doenças zoonóticas estudadas pela saúde pública em todo o mundo, devido a sua característica endêmica, dificuldade no seu controle e pela alta morbidade (BRENNER, 2000; LOURENÇO *et al*, 2004; LOUREIRO, 2010).

Os sorovares de *Salmonella* são capazes de sobreviver por muito tempo no interior das células eucariontes, pois são organismos intracelulares facultativos, invadem e se multiplicam no interior da célula hospedeira, causando quadros infecciosos tanto em seres humanos como também em animais avícolas, bovinos e até em roedores (ANDREWS-POLYMENIS *et al*, 2010).

Nas amostras clínicas foram identificados três sorovares diferentes dentre os sete isolados da subespécie *enterica*, sendo 3 (42%) *S. Paratyphi B*, 2 (29%) *S. Barielly* e 2 (29%) foram identificadas até o nível de subespécie, *S. enterica* subsp. *enterica*. O percentual dos isolados de *Salmonella* de amostras clínicas encontrados neste estudo (4,5%) corrobora com o mesmo percentual sugerido para coleta deste patógeno em casos clínicos (4%) (ORLANDI *et al*, 2006).

Os últimos registros de *S. Paratyphi B* para região norte do Brasil foi feito por Loureiro *et al* (2010) no Estado do Pará, onde isolou 4 cepas, oriundas também de infecções humanas. Diferente do Brasil, Voetsch *et al* (2004) registrou muitos casos de salmonelose

entre 1996 e 1999 nos Estados Unidos, onde se isolou 55 cepas de *S. Paratyphi B*, número muito elevado comparado ao encontrado por Loureiro *et al* (2010) e no presente estudo.

Sorovares entéricos *S. Javiana*, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* foram isolados de fezes de animais neste estudo, assim como também tem sido registrado em outras regiões do Brasil (BESSA *et al*, 2004; FERNANDES *et al*, 2003; GUGEL *et al*, 2010), tanto em amostras de fezes como de ambiente. E, de acordo com a literatura, há décadas *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* são os principais sorovares envolvidos em surtos de doenças alimentares (CDC, 2005; 2007; 2008; DIAS *et al*, 2003; FERNANDES *et al*, 2006; FREITAS NETO *et al*, 2010; GUDMUNSDOTTIR *et al*, 2003; MÜRMAN *et al*, 2008; NADVORNY *et al*, 2004; WEN ZOU *et al*, 2011;) embora *S. Javiana* também tenha sido identificada em alguns surtos (CDC, 2008; NUNES *et al*, 2010).

No levantamento dos sorovares de *Salmonella* envolvidos em surtos de salmonelose no Estado do Pará realizado por Loureiro e colaboradores (2010), *S. Javiana* não foi isolada, já *S. Enteritidis* foi o segundo sorovar mais frequente, isolado em quase todos os 18 anos de pesquisa e, neste mesmo levantamento, *S. Agona* foi identificado em amostras de coprocultura, diferente do atual estudo que foi isolada da água.

S. Stanley foi isolado de fezes de uma pessoa que não tinha sintomas gastrointestinais no momento da coleta, mas, é um sorovar frequentemente isolado de infecções humanas nos países asiáticos, onde recentemente foram registrados 79 casos de salmonelose provenientes de alimentos contaminados. Após a busca epidemiológica para descobrir a causa desse surto, alguns lugares foram fiscalizados e foi descoberto que as pessoas contaminadas haviam participado de uma festa onde o manipulador dos alimentos era um portador assintomático deste sorovar e contaminou a comida durante o preparo, conseqüentemente muitas pessoas foram infectadas ao mesmo tempo e apresentaram os sintomas de diarreia e febre. (EFSA, 2012). Na Suíça, Pastore *et al* (2008) descreveu 82 casos de salmonelose causada por este

sorovar entre os anos de 2006 e 2007, isolada também de amostras ambientais e de pessoas, assim como no presente estudo.

Um problema resultante dos surtos de salmonelose para a saúde pública é que na maioria das vezes os sintomas são diagnosticados de forma errônea, sendo confundido com sintomas de outros tipos de doenças, dificultando o tratamento, o controle e ainda, aumentando cada vez mais a chance de disseminação desses agentes no ambiente, assim como vem acontecendo na comunidade de Rio Pardo. Diante disto, observa-se a necessidade de pessoas qualificadas em laboratórios.

Salmonella enterica subsp. *arizonae* raramente está associada a surtos de intoxicação alimentar ou caso clínico, em geral são isoladas de ambiente e de animais de sangue frio (BRENNER, 2000; POPOFF; LE MINOR, 2005). No presente estudo, esta subespécie foi isolada de fezes de crianças com diarreia (caso clínico) que já apresentavam evacuações frequentes a mais de dois dias e sintomas de febre, vômito e desidratação, com um quadro de diarreia aguda.

Na Itália, a subespécie *arizonae* foi identificada e isolada em um paciente de 43 anos de idade imunocomprometido, o que não é comum para região, onde está mais associado aos animais, como cobras, tartarugas entre outros répteis (DI BELLA *et al*, 2011). Na Índia outro caso interessante foi relatado. Uma criança de 03 meses de idade chegou a óbito devido à infecção por esse sorovar, ela nasceu com microcefalia e apresentou diarreia persistente com muco e sangue, após a pesquisa epidemiológica, foi descoberto que o pai desta criança era domador de répteis, tinha contato frequente com estes animais e se tornou o veículo de transmissão para a criança (MAHAJAN *et al*, 2003).

Huehn e colaboradores (2009) relataram que alguns fatores genéticos da subespécie *arizonae* mudam quando se trata de infecção em pessoas e em animais e, que isso se torna um

fator benéfico para as infecções humanas já que tais fatores apresentam baixa virulência em humanos na maioria dos casos.

Em geral, a incidência de infecções por *Salmonella* ocorre em todo o mundo, mas, os países do Sul e Sudeste da Ásia são regiões com alto índice devido ao elevado nível de resistência desses sorovares aos antibióticos utilizados (CRUMP *et al*, 2004).

Os antibióticos são substâncias administradas para inibir ou matar certos microrganismos causadores de doenças, como as bactérias. No entanto, estes microrganismos podem desenvolver resistência, inibindo desta forma as atividades destes antibióticos e ainda podem passar esta resistência às próximas gerações (ANDREWS *et al*, 2010).

No presente estudo, utilizou-se 11 antimicrobianos e dentre estes, ciprofloxacina foi o que apresentou melhor desempenho, tanto os isolados clínicos assim como os ambientais apresentaram alta sensibilidade (Figuras 10 e 11), assim como foi também observado por Ribeiro *et al* (2006) em isolados de *Salmonella enterica*, no Rio Grande do Sul.

Diferente do Brasil, no continente asiático, ciprofloxacina não é mais indicado para o tratamento de salmonelose, pois os espécimes isolados com frequência nesta região, já apresentam alta resistência tanto a este antibiótico como também a azitromicina, outro medicamento preconizado para uso em infecções por este bacilo (VLIEGHE *et al*, 2012).

Dentre os vinte e dois isolados deste estudo, 4 (18,8%) foram resistentes ao Cloranfenicol (Figuras 10 e 11). Este antimicrobiano vem apresentando baixa atividade faz alguns anos e isto já foi observado no Estado do Amazonas por Alecrim *et al* (2002), quando isolou *S. Typhi* de amostra de fezes de uma criança. Souza *et al* (2010) isolou 44 cepas de *S. Typhi* em pacientes com febre tifoide no Estado do Pará e também observou resistência de 2,28% das cepas ao Cloranfenicol.

O tratamento recomendado pela Organização Mundial de Saúde para salmonelose não-tifoide ou gastroenterites, é a simples hidratação com água e soro, pois segundo seus

levantamentos, o uso de antibióticos prolonga a eliminação desses patógenos além de lhes conferir resistência. Para as infecções graves ou febres entéricas, recomenda-se antibióticos da classe fluoroquinolonas, cefalosporinas e ampicilina, principalmente para crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas, classe mais afetada nesses casos (WHO, 2008). Já o Hospital das Clínicas da Universidade Paulista recomenda que se utilizem os antibióticos sulfametoxazol + trimetropima, ciprofloxacina e ceftriaxone por 7 dias para casos de diarreia aguda causada por *Salmonella* (LEVIN *et al*, 2011) e de acordo com Brasil (2008); Crump & Mintiz (2010), antibióticos da classe fluoroquinolonas são as drogas de primeira escolha para o tratamento contra *Salmonella* sp. causadoras de infecções intestinais.

A prática errônea do uso de antibióticos sem o conhecimento médico passou a ser um dos determinantes que contribuem para resistência, principalmente em área com maior frequência desses patógenos. Além da resistência bacteriana, as salmonelas ainda apresentam imensa variedade de proteínas e fatores de virulência que lhes conferem também sua permanência dentro do hospedeiro, causando desde as gastroenterites até as infecções sistêmicas.

Durante a infecção, estas bactérias produzem proteínas específicas capazes de invadir as células epiteliais do intestino e permitir sua sobrevivência no interior das células fagocíticas (VALDEZ *et al*, 2009). De acordo com Trabulsi & Alterthum (2004), a maioria dos sorovares deste gênero são patogênicos ao homem, porém a sintomatologia depende do sistema imune de cada hospedeiro, ocorrendo variações no mecanismo de patogenicidade.

Neste trabalho foram pesquisados nove fatores de virulência (Tabela 5) e cada um apresentou variações em seus perfis dentre as 22 cepas isoladas e identificadas (Tabela 4).

As virulências *invA*, *slyA*, *aceK* e *agfA* (grupo B, figura 13) formaram um grupo comum a maioria das salmonelas isoladas, ou seja, todas as cepas apresentaram estes fatores (grupo B, Figura 13). O gene *invA* auxilia na invasão nas células do epitélio e pode ser

encontrado na maioria dos sorovares entéricos como foi descrito na pesquisa atual e nos estudos de Carneiro (2009); Dias *et al* (2003) e Wen Zou *et al* (2010). Os achados de Jin Hur *et al* (2011) observou esse fator de virulência em todas as 25 cepas de *S. Typhimurium* isoladas de diarreia de suínos na Koréia e Dias *et al* (2003) também observou nas 102 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de aves, suínos, humanos e alimentos, no sul do Brasil.

De acordo com Dolan *et al* (2011) e Navarre *et al* (2005), as proteínas *slyA* e *phoP* são reguladores da virulência bacteriana por *Salmonella enterica*, permitindo que esta bactéria se prolifere dentro do macrófago e suporte alto teor oxidativo. Na atual análise, estas virulências apresentaram o mesmo perfil entre os isolados clínicos e podem ter auxiliado principalmente no sintoma febre, pois, oito dos isolados que apresentaram positividade para estes genes também apresentaram febre (Figura 14A), corroborando com os resultados encontrados por Navarre *et al* (2005) e Yoon *et al* (2009).

O gene *aceK*, controlador do fluxo de isocitrato no ciclo do ácido tricarboxílico esteve presente em todos os isolados clínicos (Figura 14) e na maioria dos isolados ambientais. O'Regan *et al* (2008) buscou esta característica virulenta em salmonelas isoladas de fezes de frango e de alimentos, obtendo resultados diferentes entre os isolados de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, estando ausente em quatro cepas de *S. Enteritidis* e positivo em todas as cepas de *S. Typhimurium*, ambos isolados de frango. Neste estudo apresentou positividade virulenta para estas duas cepas, independente da origem do isolado.

Guiney *et al* (1995) descreveu que os sorovares de *Salmonella* possuem plasmídeos que podem codificar genes que induzem uma infecção sistêmica ou letal no hospedeiro, como acontece quando a virulência plasmidial *spvC* está presente nestes sorovares. No presente levantamento, *spvC* estava presente em oito dos isolados clínicos (Figura 14) e dentre os isolados ambientais, nos sorovares *S. Typhimurium* e *S. Javiana* isolados de animais e em *Salmonella* sp. e *S. Agona* isolados da água (Figura 9). Castilla (2003) identificou este fator

de virulência em cepas de *Salmonella* isoladas de fezes de pessoas, assim como Dias *et al* (2003) em 90% das cepas de *S. Enteritidis* isolados de amostras de fezes de pessoa, animais e de alimentos, no Rio Grande do Sul.

Os fatores de virulência *fimA* e *agfA* são fimbrias que conferem a aderência da *Salmonella* no interior das células invadidas e, neste estudo a virulência *fimA* foi a menos presente dentre os 22 isolados e não se apresentou como fator relevante para causar nenhum dos sintomas analisados durante a pesquisa com os casos clínicos (Figuras 13 e 14). Já a virulência *agfA* esteve presente na maioria do isolados e pode ter sido um dos fatores responsáveis pelo sintoma febre nas crianças com diarreia, mas, não foi relacionado ao sintoma desidratação (Figuras 13 A e C).

Estes dois genes já foram identificados em *S. Typhimurium* isolados de fezes de aves doentes e sadias, assim como os genes *slyA*, *fliC* e *invA*, presentes em 100% dos isolados identificados nos estudos de Martins (2010). Sukhnanand *et al* (2005) também observou estas virulências em *S. Agona* e *S. Typhimurium*, assim como no presente estudo.

Na presente análise, dentre os nove isolados clínicos, dois não apresentaram a virulência *fliC*, corroborando com os resultados de Bisi-Johnson *et al* (2011), que obteve resultado positivo para este gene em 15 cepas de *Salmonella* sp. isoladas de infecções humanas no Sul da África. Este fator de virulência possui uma proteína chamada flagelina que promove a locomoção, invasão e aderência durante o processo de invasão das células e a maioria das salmonelas entéricas possuem estas características e, é indicado como gene específico para caracterizar *S. Typhimurium* (BISI-JOHNSON *et al*, 2011; SOUMET *et al*, 1999; VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

As cinco colônias (3S, 15S, 16S, 17S e 21S) não identificadas no teste bioquímico (Tabela 4) e posteriormente comprovadas como sendo *Salmonella* sp. através do sequenciamento de DNA apresentaram positividade para todos os nove fatores de virulência

testados. Diante destes resultados, observa-se que as 22 cepas isoladas, têm capacidade para causar doença, principalmente infecções invasivas, pois, todas as salmonelas isoladas apresentaram a característica invasiva (Figura 13).

A pesquisa foi realizada com os fatores de virulência mais frequentemente utilizados na literatura. A tipagem molecular destes fatores nos isolados com diferentes origens (clínico e selvagem) possibilita investigação sobre possíveis associações entre os fatores de virulência e a origem da bactéria. Em relação à origem bacteriana, os isolados selvagens foram distintos dos clínicos pela análise de correspondência, sugerindo que possam existir características que definem um isolado patogênico. Do ponto vista dos fatores de virulência, a distinção entre isolado clínico e selvagem não ficou clara, pois, alguns fatores de virulência tiveram associações fortes com isolados das duas origens, em especial os grupo A,C e D da figura 13. Tanto os isolados clínicos quanto os selvagens apresentam potencial nocivo, visto que todos apresentaram características de virulência para se aderir, invadir e sobreviver no interior da célula (Figura 13 – B; Quadro 2).

Além dos fatores de virulência, observou-se também no presente estudo, o perfil epidemiológico dos isolados de *Salmonella* identificados para rastrear possíveis fontes de infecção e determinar a variabilidade e similaridade genética. Esta análise foi feita pela técnica de Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), conhecida como padrão ouro e com alto grau de confiabilidade para análise em *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli*, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (Figura 15).

A análise do PFGE foi obtidas pela visualização de 9 a 17 bandas ou faixas visíveis no gel, assim como também foi observado no trabalho de Gudmundsdottir *et al* (2003) que conseguiu provar que o sorovar *S. Typhimurium* foi transmitido dos animais para as pessoas em surtos ocorridos na Islândia, utilizando esta mesma ferramenta de análise molecular.

No presente estudo podemos inferir que o animal, de uma residência do ramal Samuel, de onde se isolou *Salmonella* Typhimurium (isolado 15S) foi contaminado com a água da caçimba de uma residência do ramal Principal, de onde se isolou *Salmonella* sp. (isolado 20S), já que são residências próximas e apresentaram perfil de 60% de similaridade genética.

Após a identificação das cepas de *Salmonella* isoladas das amostras de água, observou que o Rio Canoas, rio que deságua no Igarapé Rio Pardo, estava contaminado com *Salmonella* sp. (isolado 22S). No igarapé Rio Pardo foram identificados os sorovares *S. Stanley* (isolado 10S) em amostra de fezes de pessoa, *S. Typhimurium* em amostra de fezes de animal (isolado 17S) e nas análises dos grupos formados pelo PFGE sugerimos que a água proveniente do Rio Canoas pode ser a principal fonte de contaminação da pessoa (10S) e do animal (17S) (Figura 15).

O isolado 17S, proveniente de fezes de um animal de uma residência às margens do Igarapé Rio Pardo foi 100% geneticamente idêntico ao isolado 22S, proveniente da água do Rio Canoas. O isolado 13S, proveniente de fezes de pessoa residente do ramal Novo Paraíso ficou no mesmo grupo de similaridade genética aos isolados 17S e 22S, portanto ficou evidente um ciclo de contaminação por *Salmonella* sp. na comunidade Rio Pardo, já que 1 isolado proveniente de pessoa, 1 de animal e 1 da água apresentaram alta similaridade genética.

No atual estudo não foi possível obter o perfil do PFGE para quatro cepas dentre as 22 identificadas. Dentre estas cepas, estão duas das cinco colônias não identificadas no teste bioquímico, cepas 16S e 21S, isoladas de um animal e da água, respectivamente (Tabela 4). As cepas 3S, 15S e 17S que só foram identificadas através do sequenciamento, apresentaram perfis de similaridade com outras cepas dentro de cada subgrupo formado.

Foi observado durante os procedimentos que a enzima *XbaI* utilizada para esta análise, não digeriu estas 4 cepas como estava descrito no protocolo e pode-se inferir que estas cepas

apresentam modificações em suas estruturas moleculares ainda não conhecida por esta enzima. Resultados similares a este também foram descrito Gudmundsdottir *et al* (2003), onde duas cepas de *S. Typhimurium* não foram digeridas com esta mesma enzima.

A enzima *XbaI* é bastante utilizada na digestão de *S. Agona*, mas, formam perfis de similaridade diferentes no PFGE. Alguns estudos descrevem que essas diferenças ocorrem devido aos sítios de restrição conservados em seus cromossomos que não permitem ser digeridos pelas enzimas utilizadas na análise por PFGE, o que também pode ter ocorrido na atual análise com o isolado 21S (Tabela 4) (LINDQVIST, 2008; TRUJILLO *et al*, 2011).

No estudo de Mürmann e colaboradores (2008), analisando amostras provenientes de dez surtos de toxii infecção alimentar no Rio Grande do Sul, observou que todas as 14 cepas submetidas à sorotipificação foram identificadas como *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e apresentaram um único padrão no PFGE, utilizando a enzima *XbaI*, diferente do atual estudo onde não foi possível fazer a digestão do sorovar *S. Enteritidis*, isolado de fezes de um animal na área rural.

Não existe similaridade genética entre os isolados clínicos e selvagens, pois os mesmos formaram perfis diversificados e nenhuma cepa clínica apresentou 100% de identidade clonal com as cepas selvagens. As salmonelas isoladas das amostras clínicas se aproximaram dentro dos mesmos grupos, formaram três agrupamentos e somente o isolado 5 ficou disposto em um dos grupos dos isolados selvagens, como pode ser observado na figura 15, isolados sublinhados nas cores amarela, vermelha, azul e verde.

Há evidências de cepas idênticas circulando na Zona Sul (isolados 1S e 2S) do mesmo modo que ocorreu na Zona Leste (isolados 6S e 7S), estas cepas apresentaram 100% de similaridade genética. Estudos futuros *in vivo* ou *in vitro* devem ser realizados para melhor descrição e relação dessas cepas com a célula hospedeira, visando à busca de informações

sobre seus fatores de virulência e como desempenham suas funções na célula, além de estudos epidemiológicos em áreas de difícil acesso ao sistema público de saúde.

7. Conclusão

Os resultados encontrados neste estudo possibilitaram as seguintes conclusões:

- A análise fenotípica baseada no teste bioquímico não foi suficiente para identificar todas as colônias selecionadas, pois cinco destas colônias só foram confirmadas como *Salmonella* sp. após a análise de seu DNA. Sendo assim, é interessante pensar em testes bioquímicos regionais, que se baseariam em cepas regionais e não somente nos padrões de *Salmonella* utilizados em nível mundial;

- Dentre os 11 antimicrobianos utilizados, ciprofloxacina apresentou melhor atividade, todas as cepas isoladas neste estudo apresentaram alta sensibilidade a este antibiótico;

- Os isolados da área rural foram sensíveis aos antimicrobianos ciprofloxacina e piperacilina + tazobactam e resistentes a sulfametaxazol + trimetropima, nitrofurantoína e gentamicina. Já os isolados da área urbana, além de ciprofloxacina e piperacilina + tazobactam, também foram sensíveis aos antibióticos aztreonam e norfloxacina, apresentando resistência ao ácido nalidíxico, nitrofurantoína e gentamicina;

- Observou-se que as 22 cepas aqui isoladas, têm capacidade para causar doença, principalmente infecções invasivas, pois, nas análises dos fatores de virulência, todas estas cepas apresentaram características virulentas para se aderirem e invadirem a célula, além da característica para sobrevivência no interior do macrófago;

- Um isolado proveniente da área rural foi o único que apresentou associação com 7 dos 9 fatores de virulência estudados, portanto esse isolado pode ser indicado para estudos futuros que visam a produção de vacinas;

- Em relação aos sintomas febre, vômito, desidratação e sangue visível nas fezes verificamos que apenas o sintoma febre apresentou correlação com os fatores de virulência de invasão, regulador do isocitrato e fator de sobrevivência da *Salmonella* no interior do macrófago.

- A similaridade genética entre os isolados clínicos formaram 4 subgrupos, sendo que 4 (isolados 1S e 2S; 6S e 7S) apresentaram 100% de similaridade e 2 (isolados 8S e 9S) com 80%, evidenciando que há cepas idênticas circulando na zona sul do mesmo modo que ocorre na zona leste.

- Na análise da similaridade genética entre os isolados selvagens, foram formados três subgrupos. Através desta análise, ficou evidente um ciclo de contaminação na comunidade Rio Pardo, pois 1 isolado proveniente de pessoa, 1 de animal e 1 da água apresentaram alta similaridade genética.

- Já a relação clonal das cepas isoladas dos casos clínicos com as cepas selvagens, observou que são geneticamente diferentes, pois os perfis formaram grupamentos separados;

- Não podemos levar em consideração somente a caracterização fenotípica para confirmação da cepa quando se isola de lugares ainda desconhecidos e sem registros anteriores, pois na Região Norte ainda não há muitas informações sobre a identificação de enterobactérias envolvidas em surtos de salmonelose ou de diarreia aguda.

- Chama-se atenção para a importância desses sorovares e para realização contínua desse tipo de pesquisa, visando o diagnóstico correto e diminuição da resistência aos antibióticos, propondo informações úteis aos clínicos na escolha da terapia apropriada para o tratamento de infecções invasivas por *Salmonella* e para o planejamento de programas de controle e prevenção da doença.

8. Referências Bibliográficas

ABBIJIT SINGH, M.B.B.S.; THAD WILKINS, M.D.; ROBERT R. SCHADE, M.D. Salmonella Newport Bacteremia in a 12-Day-Old Infant. *JABFM*. vol. 24: 2. p.214 -217.2010.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos IV.2004. 63p.

ALECRIM, Wilson Duarte, et al. Febre Tifoide: recaída por resistência antimicrobiana: Relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.35, n. 6, p. 661-663. 2002.

ANDREWS-POLYMENIS, H.L, et al. Taming the Elephant: *Salmonella* Biology: Pathogenesis and Prevention. *Infect Immun* 2010, e-pub ahead of print. *Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940.

BARMAN, Melissa, et al. Enteric Salmonellosis Disrupts the Microbial Ecology of the Murine Gastrointestinal Tract. *Infect. Immun*, v. 76, n. 3, p. 907-915, Mar. 2008. DOI: 10.1128/IAI.01432-07.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. *Brazilian Journal Veterinary Research*, v. 24, p. 80-84. 2004.

BHATTA, D. R. et al. Serotyping, PCR, phage-typing and antibiotic sensitivity testing of *Salmonella* serovars isolated from urban drinking water supply systems of Nepal. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 588–594. 2007.

BIAO SUO, et al. Uma reação em cadeia de Polimerase Multiplex em Tempo Real para a detecção simultânea de *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 e *Listeria monocytogenes* em derivados de carne. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 7, n. 6. 2010.

BISI-JOHNSON, M. A. et al. Molecular basis of virulence in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Salmonella* species from a tertiary hospital in the Eastern Cape, South Africa. *Gut Pathogens*, v. 3, n. 9. 2011.

BISHOP, A. L.; DOUGAN, G.; BAKER, S. The *Salmonella* genome: a global review. In: ***Salmonella infections: Clinical, Immunological and Molecular Aspects***. 1. Ed. New York: University Press, 2006, p. 117-145.

BONALLI, Mario, et al. *Salmonella enterica* serotype Virchow associated with human infections in Switzerland: 2004-2009. *BMC Infectious Diseases*, v. 11, n. 49. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância e controle da febre tifoide.

Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 92 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Febre tifoide: Aspectos epidemiológicos: Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31783>. Portal da saúde. Acesso: 24/11/2012. BRASIL, 2007

BRENNER, F.W. *Salmonella* Nomenclature. *J. Clin. Microbiol.*, v. 38, p. 2465-2467, 2000.

BRITO, N. P. M. Caracterização genética de *Salmonella enterica* sorovar Panama de origem ambiental, humana, animal e alimento no Estado do Pará. 2010. 77 F. Dissertação (Mestrado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará .

BORNEMAN, J.; TRIPLETT, E, W. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. Brock Institute for Environmental Microbiology and the Department of Agronomy, University of Wisconsin-Madison, Madison. 63: 2647-2653 pp. 1997.

BUENO, S. R. Mecanismos moleculares utilizados por *Salmonella* para causar infecciones del tracto digestivo. *Gastroenterol. Latinoam*, v. 21, n. 2, p. 215-217, 2010.

CLARRIDGE, J. E. 2004 Impact of 16S rRNA gene sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 17: 840-862 pp.

CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L.R. et al. *Microbiologia*. 3 ed. São Paulo: Atheneu. 1999. p. 229-238.

CARDONA-CASTRO, N, et al. Development and evaluation of a multiplex PCR assay to identify *Salmonella* serogroups and serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 65, p. 327–330. 2009.

CARNEIRO, M.R.P. Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* Panama isoladas de fontes humana e não humana na região Nordeste do Brasil. 2009. 90 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

CARVALHO, E.S; FERRARINI, M.A.G. Salmoneloses. In: Tonelli, E.; Freire, L.M.S. 2000. Doenças infecciosas na infância e adolescência. 2 ed., Rio de Janeiro: Medsi, 584-91p.

CASADESÚS, Josep. *Salmonella*: from basic science to clinical issues. *Future Microbiol.* (2011), v. 6, n. 2, p. 133–135. 2010.

CASE, C. L.; FUNKE, B.R.; TORTORA, G.J. Microbiologia. 10ª Ed. ARTMED. 894 p. 2011.

CASTILLA, Karina Savalgni. Detecção de genes de virulência em diferentes fagotipos e robotipos de *Salmonella* Enteritidis utilizando a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). 2003. 79F. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

CDC. Centers for Diseases Control and Prevention .*Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2005. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2005/SalmonellaIntroduction2005>.

_____ Turtle-associated salmonellosis in humans-United States, 2006-2007. Morbidity and Mortality Weekly Report; 56(26):649-652. 2007f.

_____ Council of State and Territorial Epidemiologists. Position statement 05-ID-09. Serotype specific national reporting for salmonellosis. Atlanta, GA: Council of State and Territorial Epidemiologists; 2005. CDC 2008. Available at <<http://www.cste.org/PS/2005pdf/final2005/05-ID-09final.pdf>>. Acesso em: 05/02/2013.

_____ Summary of notifiable diseases—United States. Morbidity and Mortality Weekly Report, v. 57, n. 54, 87p. 2008.

_____ Salmonellosis: *Paratyphoid, Non-typhoidal Salmonellosis*. Ano: 2005. Available at: <<http://www.cfsph.iastate.edu>>. Acesso em: 18/03/2011.

_____ *Salmonellosis: Surveillance Reports*. Ano: 2013. Available at: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonellosis/#catch>. Acesso em: 29/08/2013.

CHART, H. et. al. Serodiagnosis of *Salmonella enterica* serovar Typhi and *S. enterica* serovars Paratyphi A, B and C human infections. *Journal of Medical Microbiology*, 56, 1161–1166. 2007.

CHEN, Ming-Hui, et al. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) analysis for multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolates collected in six years (2000 e 2005) from retail chicken meat in Taiwan. *Food Microbiology*, v. 28, p. 399-405. 2011.

CHIU, C.H.; OU, J.T. Rapid identification of *Salmonella* serovars in feces by specific detection of virulence genes, *invA* and *spvC*, by na enrichment broth Culture-Multiplex PCR combination assay. *J. Clin. Microbiol.*, v.10, p. 2619- 2622. 1996.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Sixteenth Informational Supplement, *Collaborating Centre for Reference Research on Salmonella, Institut*, M100-S16, v. 26, n. 6, 2009.

CORTEZ, A.L.L, et al. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.73, n. 2, p.157-163. 2006.

COSTALUNGA, S; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 33, p. 342-346. 2002.

CRUMP, J. A; LUBY, S.P.; MINTZ, E.D. The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ*, v. 82, n. 5, p.346-53. 2004.

_____. Global Trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clinical Infectious Diseases*, v. 50, p. 241-6. 2010.

D'SOUZA, D.H.; CRITZER, F.; GOLDEN, D.A. Real-time reverse-transcriptase polymerase chain reaction for the rapid detection of *Salmonella* using invA primers. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 6, n. 9, p. 1097-1106. 2009. DOI: 10.1089=fpd.2009.0322

DI BELLA, Stefano, et al. *Salmonella enterica* ssp. *arizonae* infection in a 43-year-old Italian man with hypoglobulinemia: a case report and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports*, v. 5, n. 323, 4p. 2011.

DIAS, Silvia de Oliveira, et al. Detecção de genes de virulência em *Salmonella* Enteritidis isoladas de diferentes fontes. *Brazilian Journal of Microbiology* , v. 34 (Suppl.1), p. 123-124. 2003.

_____. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 38, p. 720-728. 2007.

DOLAN, K. T.; DUGUID, E.M.; CHUAN HE. Crystal structures of slyA, a master virulence regulator of *Salmonella*, in free and dna-bound states. *J. Biol. Chem.* 13p, 2011. Doi: 10.1074/jbc.M111.245258.

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control : Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008. Stockholm, *European Centre for Disease Prevention and Control*. p. 162-167. 2008.

_____. Scientific report of EFSA and ECDC: Multi-country outbreak of *Salmonella* Stanley infections Update, Parma, Italy. *EFSA Journal*, v.10, n. 9, p. 2893. 2012. Doi:10.2903/j.efsa.2012.2893.

FERNANDES, S.A, et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop.*, S. Paulo, v. 45, n. 2, p. 59-63. 2003.

_____. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Rev. Inst. Med. trop.*, S. Paulo, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FOTI, M, et al. *Salmonella bongori* 48:z35:- in migratory birds, Italy. *Emerg. Infect. Dis.*, v.15, p. 502-503, 2009.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. São Paulo: Atheneu, 1996. 181p.

FREITAS NETO, O.C, et al. Sources of human non-typhoid salmonellosis: A Review. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.12, n. 1, p. 01-11, 2010. ISSN 1516-635X

GIAMMANCO, G.M, et al. Persistent endemicity of *Salmonella bongori* 48:z(35):--in Southern Italy: molecular characterization of human, animal and environmental isolates. *J Clin Microbiol.*, v. 40, p. 3502–3505, 2002.

GUDMUNSDOTTIR, S.; HARDARDOTTIR, H.; GUNNARSSON, E. Subtyping of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Outbreak Strains Isolated from Humans and Animals in Iceland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 23, n. 10, p. 4833–4835, oct, 2003. DOI: 10.1128/JCM.41.10.4833–4835, 2003.

GUGEL, L.A. et al. Presença de *Salmonella* no solo e nas fezes de suínos e bovinos de leite em propriedades rurais da microbacia do rio pinhal. *JINC – 4ª Jornada de Iniciação Científica Embrapa/unc.* – Concórdia, SC, 2010.

GUINEY, D. G. et al. Growth-phase regulation of plasmid virulence genes in *Salmonella*. *Trends in Microbiology*, v. 3, n. 7, p. 275-279, 1995.

_____. The role of host cell death in *Salmonella* infections. *Curr.Top. Microbiol. Immunol.*, v. 289, p. 131-150, 2005.

GUPTA, V.; KAUR, J.; CHANDER, J. An increase in enteric fever cases due to *Salmonella* Paratyphi A in & around Chandigarh. *Indian J Med Res*, v. 129, p. 95-98, 2009.

Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP: Guia de utilização de anti-infecciosos e recomendações para a prevenção de infecções hospitalares, 2012-2014. Comissão de controle de infecção hospitalar, Coordenadora Anna Sara S. Levin...[et al.]- 5. ed., São Paulo. 2011.

HOUSE, D, et al. Typhoid fever: pathogenesis and disease. *Curr opin Infect Dis*, v. 14, p. 573-8, 2001.

HUEHN, S, et al. Poultry associated *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar 4,12:d:– reveals high clonality and a distinct pathogenicity gene repertoire. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 75, p. 1011–1020, 2009.

JIN HUR, et al. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes and pulsed-field gelelectrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, v.75, p. 49–56, 2011.

KONEMAN, E. W, et al. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 6^a ed. 2006.

LEON OCHIAI, R, et al. *Salmonella* Paratyphi A Rates, Asia. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 11, p. 1764-1766, 2005.

LIEBANA, E, et al. Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, n. 12, p. 4450–4456, 2002. DOI: 10.1128/JCM.40.12.4450–4456.2002

LINDQVIST, N. Molecular characterization of endemic salmonella infections in cattle. *Finnish Food Safety Authority Evira*, 79p, 2008.

LIS, J.T. Fractionation of DNA fragments by polyethylene glycol induced precipitation. v. 65, n. 1, p. 347–53, jan, 1980.

LOUREIRO, E.C.B, et al. Sorovares de *Salmonella* de origem humana identificados no Estado do Pará, Brasil, no período de 1991 a 2008. *Rev Pan-Amaz Saúde*, v.1, n. 1, p.93-100, 2010.

LOURENÇO, M.C.S.; REIS, E.F.M.; VALLS, R. *Salmonella entérica* subsp *houtenae* sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. *Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 46, n. 3, p. 169-170, 2004.

MACIEL, B. M, et al. Ocorrência de sorotipos exóticos de *Salmonella* encontrados em cães assintomáticos nos distritos do município de Ilhéus / BA – Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 41, p. 247-253, 2004.

MAHAJAN, R.K, et al. Fatal Case of *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* gastroenteritis in na infant with microcephaly. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 5830–5832, Dec., 2003.

MANAFI, M.; SOMMER, R. Comparison of three rapid screening methods for *Salmonella* spp.: MUCAP test, MicroScreen latex and Rambach agar. *Lett. Appl. Microbiol.*, v. 14, p.163-166, 1992.

MARCUS, S.L, et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microbes Infection*. v.2, p.145-156, 2000.

MARTINS, L. M. Estudo de *Salmonella* Typhimurium de origem aviária: perfil genotípico, colonização e invasão. 2010. 127f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária e Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, São Paulo.

MERIGHI, M, et al. Resolvase-in vivo expression technology analysis of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium PhoP and PmrA regulons in BALB/c mice. *Journal of bacteriology*, v. 187, p.7407-7416, 2005.

- MÜRMAN, L, et al. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 39, p. 529-534, 2008.
- NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMITD, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.
- NASCIMENTO, J.M.C. Salmoneloses: avaliação epidemiológica, clínica e laboratorial dos pacientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas com infecção por *Salmonella* spp. no período de janeiro de 1992 a dezembro de 2002. 2007. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina, São Paulo.
- NAVARRE, W.W, et al. Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. *Molecular Microbiology*, v. 56, n. 2, p. 492–508. 2005. Doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04553.x.
- NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard - Sixth Edition, Wayne, Pennsylvania, p.19087-1898, 2003.
- NELSON, K, et al. Size and sequence polymorphism in the isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase gene (*aceK*) and flanking regions in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*. *Genetics Society of America*, v. 147, p.1509-1520, 1997.
- NUNES, Oberdan Coutinho et al. Isolamento e identificação de cepas de *Salmonella* spp. de jabutis-piranga oriundos do tráfico de animais silvestres. *Ciência Animal Brasileira*, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 168 - 173, abril, 2010. ISSN 1809-6891. Doi:10.5216/cab.v11i1.4646.
- OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: A modelo of bacterial. *Annual Review Medical*. v. 52, p. 259-274, 2001.
- OLIVEIRA, S.D. et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 34, n. 1, p. 123-124, 2003.
- OLIVEIRA, S.D, et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int J Food Microbiol.*, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005.
- OLIVEIRA, M. C.S, et al. Fundamentos práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica da reação em cadeia da polimerase. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007.
- ORLANDI, P.P. Etiology of diarrheal infections in children of Porto Velho (Rondonia, Western Amazon region, Brazil). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 39, p. 507-517. 2006. SSN 0100-879X

O'REGAN, E, et al. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple *Salmonella* serotypes in chicken samples. *BMC Microbiology*, v. 8, n. 156, 2008. Doi:10.1186/1471-2180-8-156.

Organización Panamericana de la Salud. Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilância de La Resistencia a los Antibióticos. *Rev Patol Trop. Juldec*, v. 34, n. 2, p.1-85, 2005.

OTSUKI, K.; GUAYCURÚS, T. V.; VICENTE, A. C. P. *Bacillus sphaericus* entomocidal potential determined by polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n. 1, p. 107-108, 1997.

PAITHANKAR, K. R.; PRASAD, K. S. Precipitation of DNA by polyethylene glycol and ethanol. *Nucleic Acids Res.*, v. 19, n. 6, p. 1346, mar, 1991

PARRY, C. M, et al. Typhoid fever. *N England J Med*, v. 347, p. 1770-1782, nov, 2002. DOI: 10.1056/NEJMra0202012002.

PASTOREI, R, et al. Outbreak of *Salmonella* serovar Stanley infections in Switzerland linked to locally produced soft cheese, September 2006 - February 2007. *Eurosurveillance*, v. 13, n. 37, 2008.

PEREZ, K.J. Sobrevivência em fluido gástrico simulado e capacidade de invasão intestinal de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium induzidas e não induzidas à adaptação ácida. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

PETERSEN, R. F, et al. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium highly successful outbreak strains. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 0, n. 00, 2011. DOI: 10.1089=fpd.2010.0683

POPOFF M.Y.; LE MINOR. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 8th ed. Institut Pasteur, Paris: *WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella*, 2001.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2001 (no. 45) to the Kauffmann-White scheme. *Res Microbiol*, v. 154, n. 3, p. 173-4, 2003.

PORWOLLIK, S, et al. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. Proctor and M. McClelland. *J. Bacteriol.*,v.186, n. 17, p. 5883-5898, 2004. DOI: 10.1128/JB.186.17.5883-5898.2004

PROBAC DO BRASIL. MEIOS PARA IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA. Disponível em: < www.probacbrasil.com >; Acesso em: 06/05/2011.

RABSCH, W. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infection Immunology*, v.70, p.2249-2255, 2002.

RAMBACH, A. New plate medium for facilitated differentiation of *Salmonella* spp. from *Proteus* spp. and other enteric bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* v.56, p. 301-303, 1990.

RIBEIRO, A. R, et al. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 73, n. 3, p. 357 – 360, 2006.

RIBOT, E.M. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* for PulseNet., *Foodborne Pathog Dis.*, v. 3, p. 59-67, 2009.

RODRIGUES, D.P. Ecologia e prevalência de *Salmonella* sp. em aves e material avícola no Brasil. In: Conferência Apinco de Ciências e Tecnologia Avícola. Santos/SP. Anais....Campinas: Facta, v.2, p. 223-228, 2005.

SHENGHUI CUI, et al. Characterization of *Salmonella enterica* isolates from infants and toddlers in Wuhan, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* . v. 63, p. 87–94. 2009. Doi:10.1093/jac/dkn452.

SILVA, C. H. P. M. Protocolos de Microbiologia Clínica – Parte 1. *Laboratório Landsteiner, Vitória-ES, NewsLab* - edição 86, p. 58-67 – 2008.

SOMET, C. et al. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis strains from environmental swabs of poultry houses. *Letters in Applied Microbiology*, v. 29, p. 1-6. 1999.

SOUZA, C. O, et al. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* Typhi identificadas no Estado do Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*, v. 1, n. 2, p. 61-65. 2010.

SOUZA, R.B. Perfil de Suscetibilidade antimicrobiana e avaliação molecular da resistência à quinolonas de cepas de *Salmonella* Epidêmicas e de origem avícola isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, Brasil. 2008. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná.

SOTO, S.M, et al. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. *Int J. Food Microbiol.*, v. 71, p. 35-43, 2001.

SUKHNANAND, S, et al. DNA Sequence-Based Subtyping and Evolutionary Analysis of selected *Salmonella enterica* serotypes . *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 8, p. 3688–3698, 2005. doi:10.1128/JCM.43.8.3688–3698.2005

THRELFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infectious. *FEMS Microbiol Review.*, v. 26, n. 2, p.141-8, 2002.

- TRUJILLO, S, et al. Evaluation of the taxonomic utility of six-enzyme pulsed-field gel electrophoresis in reconstructing *Salmonella* subspecies phylogeny. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 11, p. 92–102, 2011.
- Febre Tifóide*. In: Guia de Vigilância Epidemiológica. Brasília, p.350-363, 2005b.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, L. F. *Microbiologia*. São Paulo:Atheneu, 2004.
- VALDEZ, Y.; FERREIRA, R.B.; FINLAY, B.B. Molecular mechanisms of *Salmonella* virulence and host resistance. *Curr Top Microbiol Immunol*, v. 337, p. 93-127, 2009.
- VAN ASTEN, A.J; VAN DIJK, J.E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *Immunol. Med. Microbiol.*, v. 44, p. 251-259, 2005.
- VLIEGHE, E. R, et al. Azithromycin and ciprofloxacin resistance in *Salmonella* bloodstream infections in Cambodian adults . *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 12, 2012. Doi:10.1371/journal.pntd.0001933.
- VOETSCH, A, et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, n. 3, p.127–34, 2004.
- WELKER, C.A.D, et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *R. bras. Bioci.*, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44-48, 2009.
- WEN ZOU, et al. Microarray analysis of virulence gene profiles in *Salmonella* serovars from food/food animal environment. *J Infect Dev Ctries*, v. 5, n. 2, p. 94-105, 2011.
- WHO - World Health Organization. The global burden of disease: 2004 update. Geneva, 2008.
- WILDE, H. Enteric fever due to *Salmonella* Typhi and Paratyphi A. A neglected and emerging problem. *Vaccine*, v. 25, n. 29, p.5246-7, 2007.
- WINTER, S.E, et al. A rapid change in virulence gene expression during the transition from the intestinal lumen into tissue promotes systemic dissemination of *Salmonella*. *PLoS Pathogens* , v. 6, n. 8, 13p. 2010.
- YAN, S.S, et al. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. *Clinical and Applied Immunology Reviews*, v.4, p.189-204, 2003.

YANG, S.J. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. *Veterinary Microbiology*, v. 86, p. 295-30, 2002.

YOON, H, et al. Coordinated regulation of virulence during systemic infection of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS Pathog*, v. 5, n. 2, 2009.
Doi:10.1371/journal.ppat.1000306

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu, _____ responsável pelo menor, _____ aceito participar do projeto de pesquisa “Caracterização fenotípica e molecular de salmonelas de área rural e urbana de Manaus, Amazonas”, tendo sido informado da justificativa, objetivos e procedimentos que serão utilizados na pesquisa e da liberdade de recusar a participar ou retirar meu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização ou prejuízo ao nosso cuidado.

Manaus, _____ de 2009

RESPONSÁVEL:

Assinatura

Dra. Patrícia Orlandi
Rua O,N casa8 Conj Morada do Sol
Bairro: Aleixo



Digital

ANEXO 2

Questionário para estudo de doença diarreica (caso clínico)

Definição de caso: Crianças com diarreia (maior ou igual a três evacuações de fezes não formadas ou aquosas/dia), por até sete dias.

A) Informações Demográficas

Código _____ n° _____
 Nome _____
 Idade (no começo da diarreia) _____ data de nascimento ____/____/____
 Endereço: _____
 Código: _____

B) Informações clínicas

Data desta visita: ____/____/____ data do início da diarreia: ____/____/____
 duração da diarreia _____ (dias). Quantos episódios de diarreia teve no último ano:

Foi vacinado contra rotavírus? Sim () Não ()

Se sim: Quantas doses? _____

Presença de sinais clínicos

Sintomas	sim ()	não ()	desconhece ()
Febre	sim ()	não ()	desconhece ()
Vômito	sim ()	não ()	desconhece ()
Desidratação	sim ()	não ()	desconhece ()
Sangue nas fezes	sim ()	não ()	desconhece ()

C) Informações Epidemiológicas

1. O paciente foi hospitalizado nos últimos 30 dias que antecederam esta doença diarreica?
 Sim () Não () Desconhece ()

2. Há em casa outra pessoa não hospitalizada que teve diarreia nas duas semanas antes do início deste caso de diarreia?

Sim () Não () Desconhece ()

3. A criança foi amamentada por quanto tempo? _____

4. Quando uma criança evacua e você a limpa, você lava as suas mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

5. Antes de preparar os alimentos você lava as mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

6. Após você usar o sanitário você lava as suas mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

7. A criança está tomando algum antibiótico para essa diarreia?

Sim () Não () Desconhece ()

Se sim:

Que data o tratamento iniciou? ___/___/___

Qual o nome do antibiótico: _____

8. Qual o tipo de água consumida pela criança?

Água de poço () Água mineral () Água fervida () Água encanada () Água de Rio ()

9. Qual o tipo de banheiro que a criança utiliza:

Fossa asséptica () Fossa séptica () Dentro de casa () Fora da casa ()

Informações laboratoriais

Data da obtenção da amostra ___/___/___

Tipo de amostra de fezes coletada: fezes () swab ()

Foram isoladas amostras de algum patógeno? Sim () Não ()

Se sim: especifique:

Questionário para estudo de doença diarréica (controle)

Definição de controle: Crianças sem diarréia (crianças que não tenham apresentado diarréia nos últimos trinta dias).

A) Informações Demográficas

Código _____ n° _____

Nome _____

Idade (no começo da diarréia) _____ data de nascimento ____/____/____

Endereço: _____

Código: _____

B) Informações clínicas

Data desta visita: ____/____/____

Doença provável: _____

C) Informações Epidemiológicas

1. O paciente foi hospitalizado nos últimos 30 dias que antecederam esta doença?

Sim () Não () Desconhece ()

2. O paciente teve diarréia nos últimos 30 dias?

Sim () Não ()

3. A criança foi amamentada por quanto tempo? _____

4. Quando uma criança evacua e você a limpa, você lava as suas mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

5. Antes de preparar os alimentos você lava as mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

6. Após você usar o sanitário você lava as suas mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

7. A criança está tomando algum antibiótico?

Sim () Não () Desconhece ()

Se sim:

Que data o tratamento iniciou? ____/____/____

Qual o nome do antibiótico: _____

8. Qual o tipo de água consumido pela criança?

Água de poço () Água Mineral () Água fervida () Água encanada () Água de Rio ()

9. Qual o tipo de banheiro que a criança utiliza:

Fossa asséptica () Fossa séptica () Dentro de casa () Fora da casa ()

ANEXO 3

Questionário individual para estudo de doenças entéricas na comunidade de Rio Pardo/AM.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO

Nº. da casa _____ Nº. do individuo _____ Ramal: _____
 Nome: _____
 Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____
 Local de trabalho: _____ Profissão: _____
 Escola que Frequenta: _____ Série: _____

2) INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Data desta visita: ____/____/____

1. Se **diarréia**: data do início ____/____/____

Presença de sinais clínicos

Febre sim () não () desconhece ()
 Vômito sim () não () desconhece ()
 Desidratação sim () não () desconhece ()
 Presença de sangue nas fezes sim () não () desconhece ()

2. Quantos episódios de desintéria teve no último ano: _____

3) INFORMAÇÕES EPIDEMIOLÓGICAS

1. Foi vacinado contra Rotavirus:

Sim () Não () Desconhece () Não se aplica ()

2. Está tomando algum medicamento?

Sim () Não () Desconhece ()

Se sim:

Qual? _____

Quanto tempo? _____

3. Quando voce usa o banheiro você lava as suas mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece ()

4. Antes de preparar os alimentos você lava as mãos?

Sempre () habitualmente () as vezes () nunca () desconhece () Não se aplica ()

5. Água que consome:

Fervida () Clorada () Coadada () Filtrada () Decantada () Nenhum Tratamento ()
 Outro ()

6.

a) Toma mamadeira? Sim () Não () Desconhece () Não se aplica ()

b) Quando não toma todo o conteúdo da mamadeira, o que é feito com o restante do conteúdo?

Joga fora () guarda para mais tarde () desconhece () outro(),
o que? _____

7. Tipo de Leite consumido

	Sempre	geralmente	raramente	nunca	desconhece	Não se aplica
Leite de peito:	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Leite de vaca:	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Leite de cabra:	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Leite em pó:	_____	_____	_____	_____	_____	_____
Outro (qual ?)	_____					

8. Adiciona água ao leite? () Sim () Não Desconhece () Não se aplica ()

Se afirmativo qual tipo de água: _____

Quem fez Entrevista? _____

Questionário da moradia e animais para estudo de doenças entéricas na comunidade de Rio Pardo/AM.

Nº da CASA: _____ Nº de cômodos: _____ RAMAL: _____

1. Quantas pessoas dormem na casa? _____

2. Em quantos quartos dormem essas pessoas? _____

3. Qual é a renda total (aproximadamente) mensal? Valores em R\$ (545,00)

Menor que um salário mínimo ()

Acima de um salário mínimo ()

Acima de dois salários mínimos ()

Acima de três salários mínimos ()

Acima de quatro salários mínimos ()

Entre cinco e dez salários mínimos ()

Desconhece ()

4. Localização:

Em relação ao chão:

() toda suspensa () parte é suspensa () mesmo

Em relação a floresta:

() perto - <0,5km () longe - >0,5km

Em relação ao igarapé:

() perto - <0,5km () longe - >0,5km

Em relação a roça:

() perto - <0,5km () longe - >0,5km

5. Tipo de Piso:

() Chão de terra

() Madeira

() Cerâmica

() Cimento

() Taco

() Outros: _____

6. Estado do piso:

() Bom

() Regular

() Péssimo

7. Qual a fonte de água de beber?

() Poço Artesiano

() Cacimba

() Chuva

() Igarapé

() Engarrafada

() Outro: _____

8. Modo de Tratamento

() Nenhum

() Ferver

() Filtrar

() Coar

() Hipoclorito de Sódio

() Decantar

() Outro: _____

9. A água é colocada em algum recipiente antes de consumí-la?

7. () Porco _____ / _____ _____
8. () Papagai _____ / _____ _____
9. () Pato _____ / _____ _____
10. () Jabuti _____ / _____ _____
11. () Arara _____ / _____ _____
12. () Peru _____ / _____ _____
13. () Periquito _____ / _____ _____

Quem fez a entrevista? _____

Observações:

20. A casa encontra-se limpa?

Sim () Não () Desconhece () Outros:

ANEXO 4

Parecer de ética em pesquisa para a coleta nos hospitais



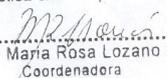
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFAM

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas aprovou, em reunião ordinária realizada nesta data, por unanimidade de votos, o Projeto de Pesquisa protocolado no CEP/UFAM com o número 266/2006, intitulado: **“Caracterização fenotípica e genotípica dos enteropatógenos isolados de crianças de 0-10 anos de idade, com diarreia aguda e de repetição na região de Manaus-Amazonas”**. Tendo como Pesquisadora Responsável Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira.

Sala de Reunião da Escola de Enfermagem de Manaus – EEM da Universidade Federal do Amazonas, em Manaus/Amazonas, 15 de março de 2007.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM


.....
Prof.ª Dr.ª Maria Rosa Lozano Borrás
Coordenadora

Parecer de ética em pesquisa para a coleta em Rio Pardo



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA-CEP/FIOCRUZ

Rio de Janeiro, 05 de setembro de 2007.

Carta: 707

De: CEP/FIOCRUZ

Para: - Dr. Sérgio Luiz Bessa Luz e
- Dr. Roberto Sena Rocha

Prezados Senhores,

Estamos encaminhando o parecer do protocolo **384/07** intitulado **"ECOLOGIA E SAÚDE NA AMAZÔNIA: MAPEAMENTO INTEGRADO E PARTICIPATIVO DAS DINÂMICAS SÓCIO-AMBIENTAIS E DE INCIDÊNCIA DE DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS NA AMAZÔNIA CENTRAL"** que está com **APROVADO**.

Atenciosamente


 CAROLINA DIAS RESTO
 Coordenadora Geral
 Comitê de Ética em Pesquisa
 Fundação Oswaldo Cruz

CPqLMD/FIOCRUZ
Coord. Biodiversidade em Saúde

Recebido em 18/09/07 às horas

Maizete
.....
Nome Legível

ANEXO 5
Registro das amostras

ID: 1651208

SOURCE: mitochondrion Salmonella

ORGANISM: Salmonella

Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales;
Enterobacteriaceae.

REFERENCE: 1 (bases 1 to 1020)

AUTHORS: Machado,A.S.R., Nobre,C. and Orlandi,P.P.

TITLE: Phenotypic and molecular characterization of Salmonella from rural and urban areas of Manaus, Amazonas.