

## Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de amostras de origem suína

[Virulence genes and genetic diversity in *Salmonella* spp. isolated from samples of swine origin]

M.S. Moura<sup>1</sup>, R.P. Oliveira<sup>1</sup>, R.T. Melo<sup>1</sup>, E.P. Mendonça<sup>1</sup>, B.B. Fonseca<sup>2</sup>, D.A. Rossi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluna de pós-graduação – Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia, MG

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia, MG

### RESUMO

A diversificação da produção industrial de alimentos de origem suína e o intercâmbio comercial de animais e seus derivados destinados ao consumo humano podem ser importantes disseminadores de sorovares de *Salmonella* spp. na cadeia alimentar. Objetivou-se avaliar em 86 cepas de *Salmonella* spp., isoladas em granja de terminação e no abate de suínos, a ocorrência de três genes de virulência (*invA*, *agfA* e *lpfA*), bem como a similaridade genética entre elas. A ocorrência do gene *invA* foi verificada em 100% das amostras. O gene *lpfA* foi detectado em 80,23% (69/86) das cepas, não foi detectado em *S. Panama* e estava presente em todas as cepas de *S. Infantis*. O gene *agfA* foi detectado em 63,95% (55/86) das amostras. *S. Agona* apresentou positividade para todos os genes de virulência estudados. A análise de homologia entre as cepas agrupou os diferentes sorovares em *clusters*. A similaridade foi independente do local de isolamento, o que demonstra a presença de clones ao longo da cadeia de produção e a existência de multiplicidade de fontes para a infecção dos animais, como a ração, e a contaminação cruzada das carcaças. A pesquisa de genes de virulência e a avaliação da proximidade gênica permitem a caracterização e um maior entendimento sobre cepas de *Salmonella* circulantes na cadeia produtiva de suínos e, assim, podem subsidiar medidas de controle durante o processo produtivo com o objetivo de garantir a saúde do consumidor.

Palavras-chave: suíno, genes, RAPD-PCR, *Salmonella*, virulência

### ABSTRACT

The diversification of industrial food production of swine origin and trade of animals and their derivatives for human consumption may be important disseminators of serovars of *Salmonella* spp. in the food chain. This study aimed to evaluate 86 strains of *Salmonella* spp. isolated from the finishing and slaughter of pigs, the occurrence of three virulence genes (*invA*, *agfA* and *lpfA*), as well as the genetic similarity between them. The occurrence of gene *invA* was observed in 100% of the samples. The gene *lpfA* was detected in 80.23% (69/86) strains and is not detected in *S. Panama*, but present in all strains of *S. Infantis*. The gene *agfA* was detected in 63.95% (55/86). *S. Agona* was positive for all virulence genes studied. The analysis of homology between the different serovars grouped the isolates in clusters. The similarity was regardless of the location of isolation, demonstrating the presence of clones along the production chain and that there are multiple sources for the infection of animals, such as feed, and cross-contamination of carcasses. A survey of virulence genes and evaluation of gene proximity allow characterization and better understanding of *Salmonella* strains circulating in the pig production chain, thus being able to support control measures during the production process in order to ensure consumer health.

Keywords: swine, genes, RAPD-PCR, *Salmonella*, virulence

### INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma doença causada pela bactéria *Salmonella*, pertencente à família Enterobacteriaceae, na qual estão descritos mais

de 2500 sorovares (Schaechter, 2009). Trata-se de um problema de saúde pública, devido à ampla distribuição na natureza e a seu caráter zoonótico, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (European..., 2009).

Recebido em 25 de abril de 2013

Aceito em 17 de dezembro de 2013

E-mail: marielasmoura@yahoo.com.br

A diversificação da produção industrial de alimentos de origem suína e o intercâmbio comercial de animais e seus derivados destinados ao consumo humano podem ser importantes disseminadores de sorovares de *Salmonella* spp. na cadeia alimentar. Dessa forma, a presença desse microrganismo representa uma relevante barreira sanitária para o comércio de animais e seus subprodutos (Seixas et al., 2009).

A invasão de células do epitélio intestinal é um fator essencial de virulência no processo de infecção pela *Salmonella* spp. (D'Aoust e Maurer, 2007). A presença do gene *invA* indica uma eficiente entrada e invasão da *Salmonella* spp. no epitélio intestinal (Whang et al., 2009). Os operons fimbriais *Salmonella* específicos são essenciais para garantir a fixação e a patogenicidade desse agente. Neste estão incluídos o operon *lpf* (*long polar fimbriae*), que regula a expressão da fímbria polar longa (Folkesson et al., 1999) e o *agf* (*aggregative fimbriae*), envolvido na codificação das fímbrias e essencial na formação de biofilme (Gibson et al., 2007).

É amplamente aceito que os animais infectados com *Salmonella* são as maiores fontes de infecção para outros animais e seres humanos. Assim, é importante o monitoramento constante com identificação dos sorovares e estabelecimento da relação epidemiológica desses ao longo da cadeia de produção, por meio de técnicas moleculares que permitem investigar a permanência do agente (European..., 2008).

O presente estudo possuiu como objetivos avaliar em cepas de *Salmonella* spp. a presença dos genes de virulência *invA*, *agfA* e *lpfA*, bem como verificar a similaridade filogenética entre estas, como forma de determinar as possíveis fontes de infecção dos animais ou de contaminação das carcaças.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 86 cepas de *Salmonella* spp., previamente isoladas e identificadas por Pacheco (2009), seguindo metodologia descrita pela ISO 6579 (2007). As cepas eram oriundas

de três lotes diferentes de suínos, coletadas na granja de terminação e em um frigorífico sob inspeção oficial. Em cada coleta (lote), foi realizada amostragem de animais (fezes) na granja de terminação e na pocilga de espera do frigorífico, após o transporte dos animais. Durante o processo de abate, foram coletadas amostras em três pontos (*swabs* após depilação, linfonodos e *swabs* após evisceração), além de amostras ambientais (ração e *swabs* de arrasto na terminação e de equipamentos no abate). As cepas estudadas foram isoladas de amostras de todas as etapas (fezes, *swabs* de carcaças suínas, ambiente, linfonodos e ração). As Tab. 1 e 2 demonstram detalhes sobre a origem das cepas e os sorovares identificados em cada etapa.

As amostras previamente identificadas como *Salmonella* spp. e mantidas congeladas foram reativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) (Difco®) durante 24 horas a 36°C, posteriormente foi feita a extração e amplificação do DNA.

Para verificar se as cepas possuíam os genes de virulência *invA*, *agfA* e *ipfA*, foram utilizados os primers descritos na Tab. 3. As cepas de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram utilizadas, respectivamente, como controles positivo e negativo.

A pesquisa de cada um dos genes de virulência foi realizada separadamente, e o processo de extração de DNA foi por lise térmica, de acordo com o descrito por Borsoi et al. (2009). As reações de PCR foram realizadas com um volume final de 25µL, sendo 2µL de DNA template (DNA da amostra); 12,5µL de buffer mix 10x (10mM Tris-HCL pH 9,0; 50mM KCL); 2,0µL de DNTP mix (250µM); 3,0mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,75U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 0,05µL de cada primer (20pmol) (Invitrogen®). As amostras foram submetidas à amplificação, composta por uma etapa de desnaturação a 94°C por cinco minutos, seguida de 35 ciclos (94°C por um segundo, 55°C por um segundo e 74°C por 21 segundos) e da extensão final a 72°C por sete minutos, com exceção do gene *agfA*, cuja temperatura de anelamento foi de 58°C.

*Genes de virulência...*

Tabela 1. Cepas de *Salmonella* spp. isoladas de suínos, discriminadas por coleta, tipo de amostra e local de coleta

Amostras coletadas	Local de coleta	Isolamentos			Total P (%)
		1 <sup>a</sup> coleta	2 <sup>a</sup> coleta	3 <sup>a</sup> coleta	
Fezes-swab retal (n=45)	Granja (terminação)	9	9	7	25 (29,07)
Ração (n=3)	Granja (terminação)	1	1	0	2 (2,33)
Água (n=3)	Granja (terminação)	0	0	0	0
Swab arrasto (n=3)	Granja (terminação)	0	0	0	0
Fezes-swab retal (n=45)	Pocilga de espera	7	8	7	22 (25,58)
Swab arrasto (n=3)	Pocilga de espera	0	0	1	1 (1,16)
Carcaça após depilação (n=45)	Frigorífico (abate)	7	3	0	10 (11,63)
Linfonodos cadeia mesentérica (n=45)	Frigorífico (abate)	3	6	2	11 (12,79)
Carcaça após serragem (n=45)	Frigorífico (abate)	7	3	3	13 (15,12)
Swab superfície depiladeira (n=3)	Frigorífico (abate)	0	0	1	1 (1,16)
Swab superfície serra (n=3)	Frigorífico (abate)	1	0	0	1 (1,16)
Swab superfície faca (n=3)	Frigorífico (abate)	0	0	0	0
Swab superfície mesa toailete (n=3)	Frigorífico (abate)	0	0	0	0
<b>Total (n= 249)</b>		<b>35</b>	<b>30</b>	<b>21</b>	<b>86 (100)</b>

n – número de amostras analisadas; P – amostras positivas para *Salmonella* spp.; % – porcentagem de amostras positivas por amostra em relação ao total isolado. Compilado de Pacheco (2009).

Tabela 2. Sorovares de *Salmonella* isolados em granja de terminação, pocilga de espera e durante etapas do abate de suínos

Sorovar	Granja de terminação	Pocilga de espera (frigorífico)	Etapas do abate (frigorífico)	TOTAL
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>S. Typhimurium</i>	8 (9,30)	5 (5,81)	15 (17,44)	28 (32,56)
<i>S. Agona</i>	9 (10,46)	6 (6,98)	5 (5,81)	20 (23,25)
<i>S. Infantis</i>	4 (4,65)	5 (5,81)	8 (9,30)	17 (19,77)
<i>S. Minnesota</i>	6 (6,98)	6 (6,98)	3 (3,49)	15 (17,44)
<i>S. Panama</i>	--	1 (1,16)	5 (5,81)	6 (6,98)
<b>Total</b>	<b>27 (31,40)</b>	<b>23 (26,74)</b>	<b>36 (41,86)</b>	<b>86 (100)</b>

N (%) – número de amostras positivas de cada sorovar e porcentagem em relação ao total de amostras identificadas como *Salmonella* spp. Compilado de Pacheco (2009).

Tabela 3. Sequência de *primers* utilizados para a reação de PCR e referência bibliográfica

Gene	Primer	Tamanho (pb)	Referência bibliográfica
<i>invA</i>	F:5'gtgaaattatcgccacgttcgggcaa3' R:5'tcatcgaccgtcaaaggaacc3'	284	Oliveira <i>et al.</i> (2002)
<i>agfA</i>	F:5'tccacaatggggcggcgcg3' R:5'cctgacgcaccattacgctg3'	350	Collinson <i>et al.</i> (1992)
<i>lpfA</i>	F:5'cttctgctgctgaatctgt3' R:5'cagtgttaacagaaaccagt3'	250	Bäumler e Heffron (1995)

F: forward; R: reverse; pb: pares de bases.

Para avaliação da similaridade genética entre as cepas de *Salmonella*, foi realizado RAPD-PCR (*Random Amplified Polymorphic DNA*), utilizando-se o *primer* P1254 (5' CCGCAGCCAA 3'), recomendado por Oliveira *et al.* (2002). A reação de PCR foi realizada com

um volume final de 25µL por amostra, contendo 100mmol Tris HCl, 750mmol KCl pH 8,8, 10mmol dNTPs (5mmol de cada – dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 50mmol MgCl<sub>2</sub>, 40pmol do *primer*, 1U de Taq DNA Polymerase 5U/µL (Invitrogen®) e 30ng de DNA. A reação PCR foi

conduzida dentro das seguintes condições: um ciclo de 95°C por cinco minutos, seguido de 40 ciclos (95°C por um minuto, 30°C por um minuto e 72°C por um minuto) e da extensão final a 72°C por cinco minutos.

Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador (Eppendorf®) em triplicata, e os produtos amplificados separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 90 minutos, com utilização do marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen®). O gel foi corado com Syber Safe (Invitrogen®) e visualizado em luz ultravioleta em transiluminador (Loccus Biotecnologia®).

Os resultados obtidos foram tabulados e submetidos à estatística descritiva, com cálculo das porcentagens de positividade para os genes de virulência estudados. As análises dos géis obtidos pela RAPD-PCR foram realizadas utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice, com tolerância de 1,5% na comparação da posição de bandas e o dendograma formado com base no método UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* – agrupamento pareado não ponderado baseado na média aritmética). Esses procedimentos e a

construção do dendograma foram realizados com o *software* GelCompar.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em 100% das cepas de *Salmonella* spp. foi detectado o gene *invA*. Estudos realizados no Brasil por Castilla (2003), em carne de frango, e por Lopes (2011), em carne bovina, para a verificação da ocorrência do gene *invA* em amostras de *Salmonella* spp., mostraram 100% de positividade em 120 amostras e 95,5% em 44 amostras, respectivamente. De acordo com Whang *et al.* (2009), o gene *invA* parece ser conservado em todos os sorovares de *Salmonella* spp. e, por isso, é utilizado como gene-alvo para a detecção da bactéria pela técnica da PCR.

O gene *agfA* foi detectado em 55/86 (63,95%) das cepas, com 100% de positividade nos sorovares *S.* Minnesota e *S.* Agona (Fig. 1). Outras pesquisas detectaram o gene *agfA* em 100% de amostras provenientes de material avícola (Cesco, 2010; Galdino, 2010). Borsoi *et al.* (2009) encontraram este mesmo gene em 91,4% de 32 cepas isoladas de aves, resultado que se diferencia da quantidade encontrada no presente estudo.

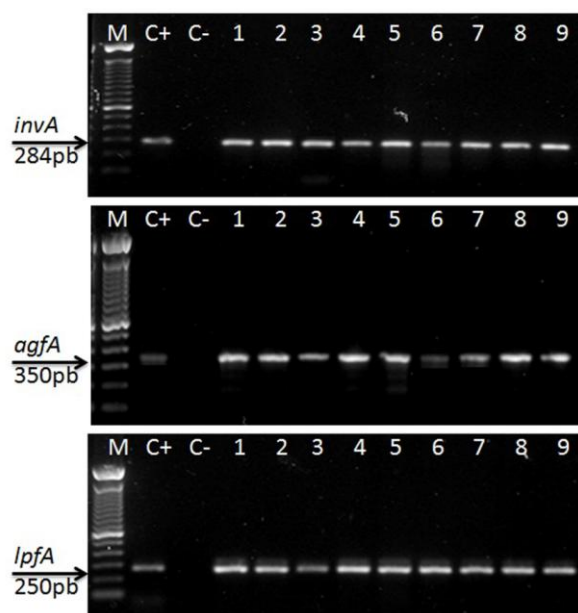


Figura 1. Genes *invA*, *agfA* e *lpfA* em *S.* Agona. M (Marcador-100pb), C+ (controle positivo *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076), C- (controle negativo *Escherichia coli* ATCC 25922), 1-9 (amostras positivas para os genes *invA*, *agfA* e *lpfA*).

O gene *lpfA* foi detectado em 69/86 (80,23%) das cepas analisadas. Nenhuma das seis cepas do sorovar Panama apresentou positividade para este gene, mas todas as 17 cepas do sorovar Infantis possuíam este gene. Cesco (2010) relatou a presença do gene *lpfA* em 100% das 45 amostras isoladas de mecônio, carcaças e cortes de frango no Rio Grande do Sul. Em trabalho realizado nos estados de São Paulo e Paraná, Galdino (2010) relatou que os genes *lpfA* e *invA* estavam presentes em 94,4% das 18 cepas isoladas de *swabs* de arrasto provenientes de aviários de frango de corte.

Entre as 86 cepas analisadas, 47 (54,65%) possuíam os três genes estudados, 30 (37,04%) dois genes e nove (11,11%) apresentaram positividade para apenas um gene. Todas as 20 cepas de *S. Agona* apresentaram positividade para os três genes de virulência estudados, seguido de *S. Minnesota*, com 73,34% (11/15); *S. Infantis*, com 58,82% (10/17), e de *S. Typhimurium*, com 28,57% (8/28), mas nenhuma das seis cepas de *S. Panama* apresentou positividade para todos os genes simultaneamente.

A associação entre sorotipos virulentos de *Salmonella* que rotineiramente produzem doença sistêmica e a presença de plasmídeos de alto peso molecular são relatadas na literatura (Barrow e Lovell, 1988). Tanto *S. Agona* quanto *S. Derby* têm sido relatados como sorovares relacionados à doença clínica em suínos, que tem aumentado significativamente, sobretudo nos Estados Unidos (Oliveira e Carvalho, 2003). As elevadas porcentagens de genes de virulência encontrados para os sorovares *S. Agona* e *S. Infantis* representam riscos de casos de salmonelose, já que estes sorovares, assim como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, são os mais associados à doença em humanos no Brasil (Loureiro *et al.*, 2010). *S. Infantis* e *S. Agona* também são reconhecidos por seu potencial patogênico, o qual, além do quadro gastroentérico, pode determinar infecção septicêmica nos animais jovens e no homem, bem como outros casos de infecções graves em crianças (Tessmann *et al.*, 2008).

A homologia entre cepas pertencentes a um mesmo sorovar é demonstrada na Fig. 2 pelos agrupamentos em dendogramas.

A análise dos dendogramas demonstrou as porcentagens de similaridade entre as cepas que foram agrupadas em *clusters*. Os resultados mostram que a similaridade entre as cepas de um mesmo sorovar foi independente do local de isolamento, ou seja, de carcaças ou fezes, com exceção do sorovar Panama, no qual se observou que o grupo J continha cinco cepas provenientes de carcaça e uma amostra proveniente de fezes com perfil distinto (Fig. 2e).

Foram discriminados quatro *clusters* (A, B, C e D), contendo cinco grupos de clones, e três cepas apresentaram perfil distinto em *S. Typhimurium*, todas da primeira coleta, porém com similaridade maior que 80% com pelo menos um dos clones (Fig. 2a). Os resultados indicam que a presença de *S. Typhimurium* nas fezes dos animais contribui para a contaminação da carcaça após o abate, o que demonstra que medidas de controle no campo, se eficientes na redução da presença desse sorovar no conteúdo intestinal dos animais, também auxiliam na diminuição dele durante as etapas de abate e, conseqüentemente, no risco de infecção de humanos.

*S. Agona* foi agrupada em dois grupos clonais distintos, com similaridade de 78,7% entre eles (E e F), um com quatro e outro com 16 cepas, provenientes da primeira e segunda coletas (Fig. 2b). Apesar de esse sorovar ter sido isolado tanto de animais vivos como de carcaças, não foi identificado após evisceração. É provável que as condições de processamento pós-abate tenham limitado sua sobrevivência e multiplicação, e isso explica, em parte, sua ausência nas carcaças após a serragem.

Das amostras ambientais, *S. Typhimurium* e *S. Agona* foram isoladas de ração na primeira e segunda coletas, respectivamente. A análise do dendograma indica que possivelmente esta foi a fonte de infecção dos animais na granja de terminação, pois *S. Typhimurium* isolada da ração apresentou homologia de 92,3% com sete amostras isoladas de fezes (A) (Fig. 2a). No caso do sorovar *Agona*, a amostra de ração está inserida no perfil F, grupo clonal, com mais 15 cepas, sendo 11 provenientes de fezes (Fig. 2b). A importância da ração como forma de infecção de suínos corrobora resultados de estudos de alguns pesquisadores (Kich *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2006).

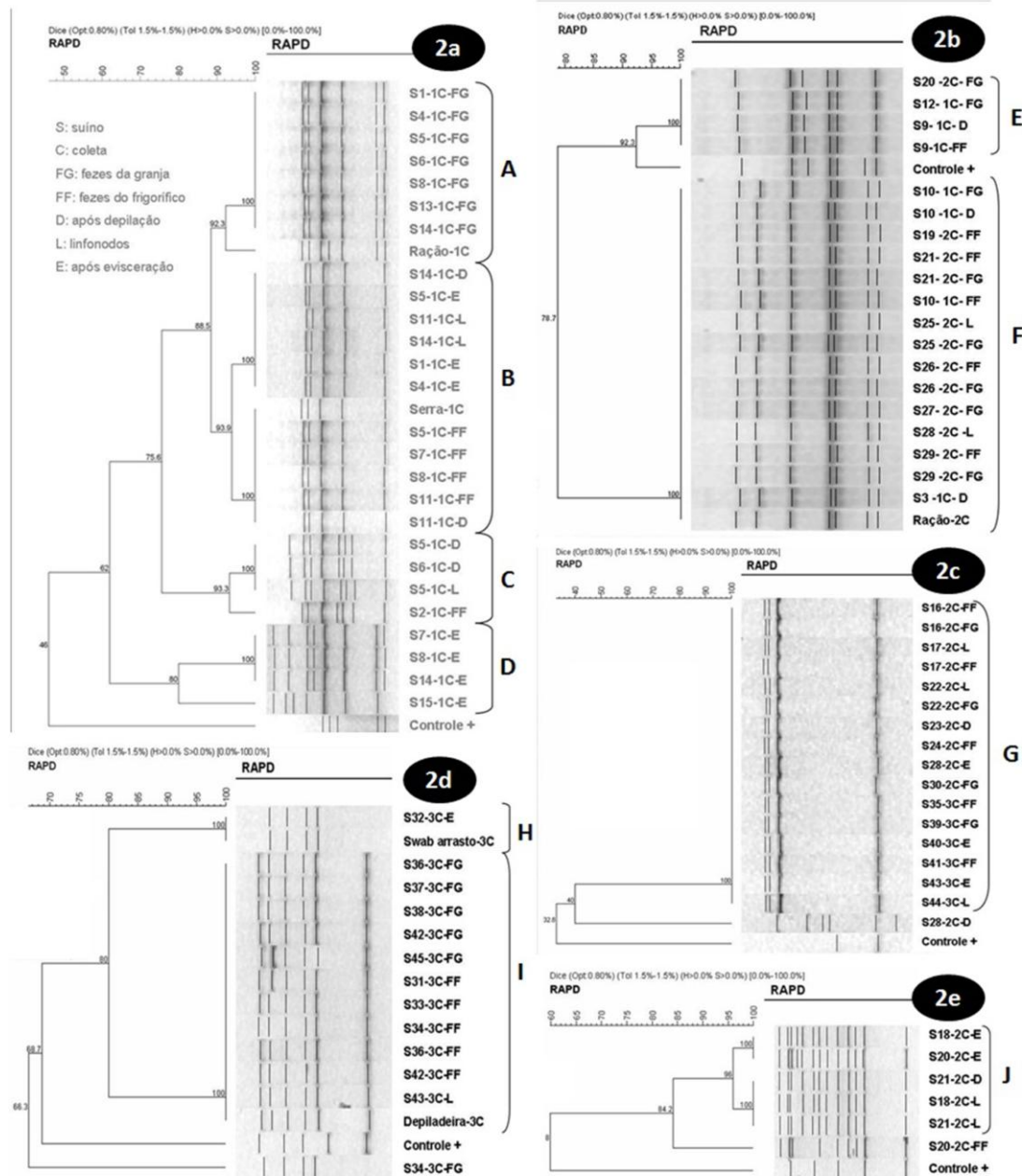


Figura 2. Dendrogramas dos 86 cepas de *Salmonella* discriminados por sorovar. (2a) *S. Typhimurium*. (2b) *S. Agona*. (2c) *S. Infantis*. (2d) *S. Minnesota*. (2e) *S. Panama*. (S) suíno, (C) coleta, (FG) isolados de fezes dos animais na granja, (FF) isolados de fezes dos animais no frigorífico, (D) etapa após depilação, (L) linfonodos, (E) etapa após evisceração.

A classificação dentro de um mesmo grupo clonal de *S. Agona* isolados de fezes de lotes sucessivos de animais alojados na granja (primeira e segunda coletas) sugere negligência às normas de biossegurança, o que pode contribuir para a manutenção do microrganismo no ambiente. Porém, esse comportamento não se

repetiu para *S. Typhimurium*, o mais prevalente na primeira coleta. Assim, é possível que os animais amostrados já estivessem infectados com *S. Agona* em etapas de criação anteriores, como desmame e creche. Essa hipótese está de acordo com estudo de Müller *et al.* (2009), os quais relataram que, entre as fontes mais

importantes de infecção dos animais por *Salmonella* na produção de suínos, podem ser destacados o alojamento de animais portadores que sofreram a infecção na fase de creche e a contaminação residual das instalações.

A alta porcentagem de cepas de *S. Typhimurium* durante todas as etapas de abate corrobora o fato de este ser o sorovar mais isolado em alimentos de origem suína no Brasil (Spricigo *et al.*, 2008). Já para o sorovar Agona, apesar de ser o segundo mais frequente neste estudo, a positividade concentrou-se nas amostras de fezes, com baixo isolamento durante as etapas de abate.

A contaminação cruzada também parece ser importante na disseminação de *S. Typhimurium* ao longo da cadeia de produção. A cepa isolada na serra pertence ao mesmo grupo clonal que quatro cepas de fezes coletadas de animais alojados na pocilga do frigorífico e apresenta similaridade de 93,9% com outro grupo clonal, que envolve seis cepas isoladas de amostras coletadas após depilação, em linfonodos ou na carcaça após evisceração, inserido no *cluster* B.

A maior similaridade entre as cepas foi observada para *S. Infantis*, com 16 isoladas na segunda e terceira coletas pertencentes a um mesmo grupo clonal (G). A exceção foi uma cepa com perfil distinto, isolado do suíno 28, que era proveniente da segunda coleta (Fig. 2c).

É possível que a presença do sorovar *Infantis* nas amostras de fezes esteja relacionada à contaminação ambiental na granja ou à infecção dos animais em etapas anteriores à terminação, já que os isolados da segunda e terceira coletas pertencem ao mesmo grupo clonal. Porém, esse sorovar não foi isolado no *swab* de arrasto realizado na granja que alojava os animais.

*S. Minnesota* apresentou dois grupos clonais (H e I) com similaridade de 80%, um agrupando 12 cepas e outro duas. Uma cepa apresentou padrão distinto das demais (Fig. 2d). Entre as seis amostras ambientais da segunda coleta, esse sorovar foi identificado em duas ocasiões, uma de *swab* de arrasto da pocilga no frigorífico e uma da superfície da depiladeira. A homologia de 100% da amostra isolada na superfície da depiladeira com 10 cepas de fezes (I) demonstra que a infecção dos animais é a fonte de

contaminação do ambiente do abate. Porém, o número de isolamento desse sorovar foi baixo nas carcaças, com positividade somente em uma amostra de linfonodo (suíno 43) e uma de carcaça após evisceração (suíno 32). Isto sugere que, apesar da boa adaptação ambiental que permite sua permanência no ecossistema, o perfil que englobou o maior número de cepas desse sorovar não permanece nas carcaças ou sofre injúria durante o processo de abate e, assim, mantém-se em números não detectáveis na técnica de isolamento tradicional utilizada neste estudo.

Outra hipótese para explicar o baixo número de isolamentos de *S. Minnesota* nas etapas de abate é a possibilidade de que algum evento especificamente ligado à terceira coleta tenha influenciado nos resultados, como o número de animais abatidos, a ordem de abate dos animais amostrados em relação aos demais ou mudanças dos procedimentos internos. Não houve controle neste trabalho com relação a esses eventos ou informação sobre mudanças na concentração de cloro da água de lavagem ou quantidade/tipo de agentes químicos utilizados para a limpeza e desinfecção. Assim, não foi possível determinar se houve alguma mudança nos procedimentos em relação aos outros procedimentos de abate.

As seis cepas identificadas como *S. Panama* formaram um *cluster* com 96% de similaridade (J), e uma cepa não foi agrupada em nenhum deles. Todas as cepas eram provenientes da segunda coleta. Das seis cepas, somente uma foi proveniente de fezes (suíno 20) e apresentou 84,2% de homologia com as demais. Tais resultados demonstram que a contaminação da carcaça por esse sorovar durante as etapas de abate provavelmente não esteja relacionada à infecção prévia dos animais (Fig. 2e).

Os sorovares *Infantis* e *Panama*, mais isolados nas amostras de carcaças na segunda coleta, segundo a Anvisa, estão incluídos entre os sorotipos mais frequentemente identificados em amostras humanas oriundas de surtos de doenças transmitidas pelos alimentos no Brasil (Rodrigues, 2005). Spricigo *et al.* (2008) relatam que *S. Panama*, *S. Agona* e *S. Infantis* foram os sorovares mais identificados em amostras de língua suína em Santa Catarina, fato que demonstra a importância destes sorovares na saúde pública.

Ao se avaliar a presença de genes de virulência, constatou-se que os *clusters* E e F de *S. Agona* e H de *S. Minnesota* foram compostos por cepas que apresentaram genes em comum, o que evidenciou, mais uma vez, a elevada proximidade filogenética. Essa correlação também representa um dado importante na investigação epidemiológica da identificação de grupos de cepas com maior potencial patogênico.

Os *clusters* E, F, G, H, I englobaram a maioria das cepas que possuíam todos os genes de virulência estudados. Já os grupos clonais A, B, C e D, todos de *S. Typhimurium*, foram compostos por cepas que possuíam principalmente o gene *lpfA*. O grupo J de *S. Panama* apresentou três cepas com o gene *agfA*, e as demais somente o *invA*, gene comum a todas as cepas do estudo.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a necessidade de monitoramento da presença de *Salmonella* na criação de suínos. Indicam também que o monitoramento e o controle devem acontecer em todas as etapas de produção até o abate, pois diferentes fatores parecem influenciar a permanência ou não de determinados sorovares na carne produzida.

### CONCLUSÕES

A presença de todos os genes de virulência em 54,65% das cepas avaliadas atenta para o risco de doença clínica tanto em suínos quanto em humanos. *S. Agona* representa o sorovar com o maior número de genes relacionados à virulência. A relação filogenética entre as cepas indicou que o consumo de ração contaminada é uma possível fonte de infecção dos animais pelos sorovares *Agona* e *Typhimurium* e que a contaminação cruzada contribuiu para a disseminação de *S. Typhimurium* durante as etapas de abate, o que aumenta o risco de contaminação da carne e de infecções em humanos.

### REFERÊNCIAS

BARROW, P.A.; LOVELL, M.A. The association between a large molecular mass plasmid and virulence in a strain of *Salmonella Pullorum*. *J. Gen. Microbiol.*, v.134, p. 2307-2316, 1988.

BÄUMLER, A.J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analyses of *lpfabcde*, A putative fimbrial operon of *Salmonella Typhimurium*. *J. Bacteriol.*, v.177, p.2087-2097. 1995.

BORSOI, A.; SANTIN, E.; SANTOS, L.R. *et al.* Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of *Salmonella Heidelberg* strains with different virulence gene profiles, antimicrobial resistance, and pulse field gel electrophoresis patterns to intestinal changes evaluation. *Poultry Sci.*, v.88, p.750-758, 2009.

CASTILLA, K.S. *Detecção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de Salmonella Enteritidis utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)*. 2003. 77f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

CESCO, M.A.O. *Pesquisa de fatores associados a virulência de Salmonella Hadar através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)*. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

COLLINSON, S.K.; EMODY, L.; TRUST, T.J. *et al.* Thin aggregative fimbriae from diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, v.174, p.4490-4495, 1992.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. (Ed). *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington: ASM Press, 2007.

EUROPEAN Food Safety Authority - *Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard*. The EFSA Journal. Italy, n.765, p.1-87, 2008.

EUROPEAN Food Safety Authority - *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007*, The EFSA Journal. Italy, p.223, 2009.

FOLKESSON, A.; ADVANI, A.; SUKUPOLVI, S. *et al.* Multiple insertions of fimbrial operons correlate with the evolution of *Salmonella* serovars responsible for human disease. *Mol. Microbiology*, v.33, p.612-622, 1999.



- GALDINO, V.M.C.A. *Pesquisa de genes de virulência e antibiograma em Salmonella spp. de origem avícola*. 2010. 55f. Monografia (Especialização em Ciência Avícola) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- GIBSON, D.L.; WHITE, A.P.; RAJOTTE, C.M. *et al.* AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology Sgm*, v.153, p.1131-1140, 2007.
- ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4ed, 2002. The International Organization for Standardization, 2007.
- KICH, J.D.; MORES, N.; PIFFER, I.A. *et al.* Fatores associados à soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais suínos. *Cienc. Rural*, v.35, p.398-405, 2005.
- LOPES, J.T. *Salmonella spp na cadeia de produção de carne bovina de exportação: ocorrência, perfil de susceptibilidade antimicrobiana, genes de virulência e perfil de macrorrestrrição por PFGE*. 2011. 98f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LOUREIRO, E.C.B.; MARQUES, N.D.B.; RAMOS, F.L.P. *et al.* *Salmonella* serovars of human origin identified in Pará state, Brazil from 1991 to 2008. *Rev. Pan-Amazonica Saude*, v.1, p.93-100, 2010.
- MÜLLER, M.; SCHWARZ, P.; KICH, J.D.; CARDOSO, M.R.I. Perfil sorológico e de isolamento de *Salmonella* sp. sm suínos no início da terminação e ao abate. *Cienc. Anim. Bras.*, v.10, p.931-937, 2009.
- OLIVEIRA, C.J.B.; CARVALHO, L.F.O.S. Infecções por *Salmonella* em suínos: panorama e perspectivas. *Suinocultura Indust.*, v.3, p.35-39, 2003.
- OLIVEIRA, S.D.; SANTOS, L.R.; SCHUCH, D.M.T. *et al.* Detection and identification of *Salmonella* from poultry related samples by PCR. *Vet. Microbiol.*, v.87, p.25-35, 2002.
- PACHECO, M.T.N. *Salmonella sp. em rebanho comercial de suínos e em suas carcaças processadas no frigorífico*. 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- RODRIGUES, D.P. Vigilância de *Salmonella*. In: Capacitação e Controle de *Salmonella* - WHO - Global *Salmonella* Surveillance. Aula ministrada na FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 26 set. 2005.
- SCHAECHTER, M. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. 2.ed, 2009. p.415-416.
- SEIXAS, F.N.; TOCHETTO, R.; FERRAZ, S.M. Presença de *Salmonella* spp. em carcaças suínas amostradas em diferentes pontos da linha de processamento. *Cienc. Anim. Bras.*, v.10, p.634-640, 2009.
- SILVA, L.E.; GOTARDI, C.; VIZZOTTO, R. *et al.* Infecção por *Salmonella* sp. em um sistema integrado de produção de suínos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.455-461, 2006.
- SPRICIGO, D.A.; MATSUMOTO, S.R.; ESPÍNDOLA, M.L. *et al.* Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de lingüiças suínas tipo frescal em Lages, SC. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.517-520, 2008.
- TESSMANN, C.; ZOCHE, F.; LIMA, A.S. *et al.* Ocorrência e Perfil de sensibilidade a antibióticos de *Salmonella* spp isolada em cortes de carne suína comercializados em feiras livres de Pelotas (RS). *Bol. Centro de Pesq. de Proce. de Alim.*, v.26, p.307-313, 2008.
- WHANG, Y.P.; LIA, L.; SHENA, J.Z. *et al.* Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. *Vet. Microbiol.*, v.133, p.328-334, 2009.