

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

LAURA BEATRIZ CARNEIRO REZENDE

**PERFIS DE VIRULÊNCIA DE *Salmonella* Typhimurium ISOLADAS DE
ALIMENTOS E AMOSTRAS CLÍNICAS DE HUMANOS**

UBERLÂNDIA

2019

LAURA BEATRIZ CARNEIRO REZENDE

**PERFIS DE VIRULÊNCIA DE *Salmonella* Typhimurium ISOLADAS DE
ALIMENTOS E AMOSTRAS CLÍNICAS DE HUMANOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA

2019

LAURA BEATRIZ CARNEIRO REZENDE

PERFIS DE VIRULÊNCIA DE *Salmonella* Typhimurium ISOLADAS DE ALIMENTOS E AMOSTRAS CLÍNICAS DE HUMANOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do título de Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

Uberlândia, 19 de dezembro de 2019

Banca Examinadora

Prof. Dr^a. Daise Aparecida Rossi
Universidade Federal de Uberlândia

Prof^a. Dr^a. Roberta Torres de Melo
Universidade Federal de Uberlândia

M.V. Raqueline Figueredo Braz
Universidade Federal de Uberlândia

UBERLÂNDIA

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo carinho e suporte emocional para que eu concretize o sonho da graduação em Medicina Veterinária.

A Deus por ter me dado forças para que me mantivesse focada no meu objetivo.

À minha orientadora professora Daise, pela oportunidade de trabalho e toda a equipe do laboratório pelo auxílio na execução da pesquisa.

Aos amigos que sempre estiveram presentes, que fizeram os dias mais leves e contribuíram para fazer da graduação a melhor fase da minha vida. A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação.

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) são consideradas um problema de saúde pública em todo o mundo, e alguns dos principais patógenos envolvidos são os representantes do gênero *Salmonella*. O sorovar Typhimurium é um dos mais recorrentes e acomete seus hospedeiros causando distúrbios entéricos como vômito, dor abdominal, febre e diarreia. Objetivou-se determinar a presença de genes de virulência em 43 isolados de *S. Typhimurium* provenientes de alimentos e amostras clínicas de humanos pertencentes a Coleção Biológica de Bactérias de Interesse em Saúde do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ). Pesquisou-se os genes *sefA*, *lpfA* e *agfA*, *sivH*, *hilA*, *invA* e *sopE*, *avrA* e *spvC* utilizando técnica de PCR convencional e os resultados foram utilizados para criar perfis de virulência. Os resultados gerais das amostras mostraram que as cepas estudadas apresentaram no mínimo cinco genes de virulência, que se expressos, podem representar um risco à saúde pública. A positividade para o gene *lfpA* foi de 95,3% (41/43), para *avrA* 97,6% (42/43), para *spvC* 39% (17/43), para *sopE* 6,9% (03/43) e para *sefA* 0% (0/43). A diversidade de locais e origens dos isolados não permitiu estabelecer relação epidemiológica entre os isolados.

Palavras-chave: Genes de virulência, Patógeno alimentar, Zoonoses.

ABSTRACT

Foodborne diseases (DTA's) are a major public health problem worldwide and some of the main pathogens involved are representatives of the *Salmonella* genus. The Typhimurium serovar is one of the most recurrent and affects its hosts causing enteric disorders such as vomiting, abdominal pain, fever and diarrhea. The objective of this study was to verify the presence of virulence genes in *S. Typhimurium* from 43 isolates from food and clinical samples of humans from the Biological Collection of Bacteria of Interest to Health of the Oswaldo Cruz Institute (IOC / FIOCRUZ). The *sefA*, *lpfA* and *agfA*, *sivH*, *hilA*, *invA* and *sopE*, *avrA* and *spvC* genes were searched using the conventional PCR (polymerase chain reaction) technique and the results were used to create virulence profiles. The general results of the samples show that the strains studied presented at least five virulence genes, which, if expressed, may represent a risk to public health. The positivity for the *lfpA* gene was 95.3% (41/43), for *avrA* 97.6% (42/43), for *spvC* 39% (17/43), for *sopE* 6.9% (03/43) and for *sefA* 0% (0/43). However, the diversity of locations and origins of the isolates did not allow an epidemiological relationship, requiring further studies using techniques that allow this type of correlation.

Key-words: Food pathogen, Zoonoses, Virulence genes.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO LITERATURA	10
2.1 <i>Doenças transmitidas por alimentos</i>	10
2.2 <i>Salmonella spp e salmonelose</i>	10
2.3 <i>Genes de virulência em Salmonela spp</i>	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 <i>Delineamento</i>	14
3.2 <i>Pesquisa dos genes de virulência</i>	15
3.3 <i>Análise de dados</i>	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
5 CONCLUSÃO	20
REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTA's) são enfermidades responsáveis por inúmeras hospitalizações e óbitos em todo o mundo. No Brasil foram constatados 6.900 surtos de DTA's de 2009 a 2018 e *Salmonella* spp foi o segundo patógeno mais incriminado (BRASIL 2018). Nos Estados Unidos, o *Center for Disease Control and Prevention* identifica aproximadamente 1,2 milhões de casos de salmonelose por ano (CDC, 2019), e na Europa, 90 mil casos foram reportados em 2017 (EFSA, 2019).

O sorovar Typhimurium é um dos mais prevalentes em casos e surtos de salmonelose (SUEZ et al., 2013), desencadeando enterites, dor abdominal, náuseas, vômitos, diarreia e febre (MORROW & FUNK, 2001).

A principal forma de aquisição da salmonelose humana é pela ingestão de alimentos, de origem animal ou não, ou água contaminadas pela bactéria (BRASIL, 2018). A gravidade da enfermidade varia conforme fatores relacionados ao hospedeiro ao patógeno. Em relação ao hospedeiro há influência direta da idade e a imunidade, e em relação ao patógeno, a presença de flagelos, fimbrias, mobilidade, habilidade de invasão e replicação, assim como, a resistência aos antimicrobianos (VIEIRA, 2009). Entretanto, os mecanismos de interação da *Salmonella* spp. com o seu hospedeiro são complexos e influenciados por outros fatores (SILVA, 2011).

Um dos fatores que podem influenciar no grau de virulência de *Salmonella* spp é a presença de genes específicos que conferem maior patogenicidade, contribuindo em mecanismos como a invasão, lesão ou adesão do patógeno às células intestinais do hospedeiro. A pesquisa e identificação dos genes de virulência são indispensáveis para o conhecimento da patogenicidade de bactérias zoonóticas (ELEMFAREJI et al., 2013; MENDONÇA, 2016). O potencial gênico para causar sintomas clínicos ou quadros mais graves de salmonelose podem ser determinados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (YAN et al., 2003).

O conhecimento das características do patógeno é essencial para estudos epidemiológicos de monitoramento e para o desenvolvimento de ferramentas de controle (BORGES et al. 2013).

Objetivou-se avaliar a presença dos genes de virulência *sefA*, *invA*, *agfA*, *avrA*, *lpfA*, *sivH*, *hilA*, *spvC*, *sopE*, *avrA* e *spvC* por meio da técnica de PCR em 43 cepas de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos e amostras clínicas de humanos no Brasil entre os anos de 2011 a 2017.

2 REVISÃO LITERATURA

2.1 Doenças transmitidas por alimentos

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) são um problema de saúde pública mundial e podem ser causadas por bactérias e seus metabólitos, parasitas, vírus ou toxinas. É estimado que existam mais de 250 tipos de DTA, sendo estas causadoras de graves problemas de saúde pública e expressivas perdas financeiras (OLIVEIRA et al., 2010). Existem variáveis que influenciam diretamente na gravidade da doença, destacam-se a quantidade ingerida do micro-organismo e os fatores de virulência expressos por este; a imunidade, idade e hábitos alimentares do indivíduo no que se refere ao hospedeiro (FORSYTHE, 2013).

Essas enfermidades acometem principalmente o sistema entérico (DIAS et al., 2011), gerando sintomas como náuseas, vômitos e febre (BRASIL, 2011). Dentre as bactérias responsáveis pela maior quantidade de surtos nos últimos 17 anos no Brasil foram *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2018). Entre os anos de 2000 a 2017 foram constatados 12.503 surtos, sendo que 2.340.201 pessoas foram expostas, 236.403 ficaram doentes com desfecho de 182 óbitos (SINAN/SVS/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

A origem da contaminação é diversa, sendo que uma das possíveis formas ocorre durante a produção de alimentos, abate de animais e falhas no processamento, manipulação e acondicionamento de produtos alimentícios (ALVES, S.D; PINHEIRO et al., 2016). Dentre os locais com maiores incidências de surtos relacionados a doenças transmitidas por alimentos são residências, restaurantes, instituições de ensino e refeitórios. (FERRAZ et al., 2015).

2.2 *Salmonella* spp e salmonelose

Salmonella spp é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae* e que se apresenta em forma de bacilos gram negativos, não esporuladas, não capsuladas e são anaeróbias facultativas. (OCHOA, 2005). O gênero *Salmonella* apresenta duas espécies,

S. bongori e *S. enterica*. Esta última possui seis sub-espécies, que são *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *indica* e *houtenae* (CARDOSO & TESSARI, 2013).

O micro-organismo possui diversos sorovares, sendo que classificam-se quanto ao hospedeiro. Podem ser específicas ao ser humano como *Salmonella* Typhi e Paratyphi; aos animais como *Salmonella* Dublin de bovinos, *S. Cholerasuis* de suínos e *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* em aves. No entanto, representantes como *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium acometem homens e animais e, por isso, são classificadas como zoonóticas (BRASIL, 2011). Sorovares como *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Newport* são os de grande relevância ao que tange à saúde humana (HAVELAAR et al.,2015).

O *Center for Disease Control and Prevention* identifica aproximadamente 1,2 milhões de casos de salmonelose por ano nos Estados Unidos (CDC, 2019), na Europa esse número foi de 90 mil casos em 2017 (EFSA, 2019). *Salmonella* spp. foi a segunda maior responsável por doenças transmitidas por alimento no Brasil de 2009 a 2018, com cerca de 11,2% dos casos, ante 24% causadas por *Escherichia coli*. No Brasil foram constatados mais de 6.900 surtos de DTA's de 2009 a 2018, o que acarretou em 672.873 expostos, 16.817 hospitalizados, 120 mil indivíduos doentes e 99 mortes (BRASIL, 2018).

O indivíduo contrai salmonelose através da ingestão de alimentos contaminados (SHINOHARA et al., 2008). O preparo e o armazenamento inadequado dos alimentos podem contribuir para multiplicação do patógeno e conseqüente aumento da carga microbiana, o que faz com que o indivíduo contraia a doença ao consumi-los (Morrow & Funk, 2001). Em hospedeiros com sistema imunológico normal, a quantidade de bactérias para que se adquira a doença é de 10^5 a 10^8 , porém em imunossuprimidos essa dose pode ser inferior à 10^3 UFC (BRASIL, 2011). A sintomatologia da doença se apresenta entre 12 a 72 horas após a ingestão do alimento contaminado e é marcada por náuseas, vômito, dor abdominal, diarreia, febre que podem durar até uma semana (MORROW & FUNK, 2001).

A salmonelose é considerada a DTA mais disseminada em todo o mundo e um grande gargalo para saúde pública. A transmissão ocorre de forma horizontal através da ingestão de produtos de origem animal de aves, suínos e bovinos contaminados (BRASIL, 2011). Para aves, essa transmissão acontece tanto horizontal como verticalmente, logo a bactéria é transmitida para o ovo (WHITE; FEDORKA-CRAY; CHILLER, 2006). Produtos agrícolas, como hortifrutis, também pode ser fontes de

infecção, uma vez que podem ser contaminados pela exposição à água contendo a bactéria (BRASIL, 2011).

2.3 Genes de virulência em *Salmonella* spp

A pesquisa e identificação dos genes de virulência são indispensáveis para o conhecimento da patogenicidade de bactérias zoonóticas (MENDONÇA, 2016). As IP (Ilhas de patogenicidade) são regiões em que estão localizados a maioria dos genes de virulência da bactéria (FERREIRA et al., 2008), estes genes podem ser de resistência a antibióticos como o *strA* e o *strB* para a estreptomicina; de adesão (adesinas, *lpf*, *sefA*), invasão (*Inv*, *agf*), inibição de respostas do hospedeiro (*pagC*, *spvC*), entre outros (ELEMFAREJI et al., 2013; VIEIRA, 2009).

O gene *lpf*, que codifica a fimbria polar longa, é correlacionado ao aumento da patogenicidade da bactéria, uma vez que este se fixa as células M da placa de *peyer* (OCHOA et al., 2005). Já o gene *agfA* - fimbria agregativa – atua aumentando o tempo de vida da bactéria em ambientes desafiadores, atuando de forma a se fixar e invadir as células, estruturando a matriz extracelular e agrupando os micro-organismos (GIBSON et al., 2007). Ambos estão correlacionados à produção de fímbrias para formação de biofilme e adaptação ao meio (WEBER et al., 2019; BORGES et al., 2013).

O gene *invA* codifica a proteína *InvA* que fica localizada na membrana interna da bactéria e é considerado um padrão para PCR, uma vez que é um gene conservado e presente na maioria dos sorotipos (RAHN et al., 1992; WHANG et al., 2009; WILKINS et al., 2010). Esse gene também é responsável pela identificação do hospedeiro e a entrada da bactéria nas células do epitélio (BORGES et al., 2013). O gene *spvC* é responsável pela adaptação, sobrevivência e disseminação da bactéria no indivíduo (HUR et al., 2011; PAL et al., 2017).

O gene *avrA*, por sua vez, atua diminuindo as reações inflamatórias do hospedeiro e realizando a apoptose de algumas células, principalmente de macrófagos (BEN BARAK Z et al., 2006). O gene *sivH* codifica a produção de proteínas que atingem as placas de *peyer* do intestino e auxiliam na invasão celular. Já o gene *sopE* codifica a proteína *SopE* que irá realizar a desestruturação da membrana celular do hospedeiro permitindo a invasão pela bactéria (MIRMOMENI et al., 2008).

O gene *hilA* faz parte do complexo de secreção do tipo três (TTSS), assim como

os genes *avrA*, *sivH* e *sopE*, e também age na identificação e invasão do hospedeiros assim como na indução de apoptose de macrófagos (CRACIUNAS et al., 2012). O gene *sefA*, é capaz de induzir a expressão de estruturas proteicas na superfície que auxiliam na fixação desta nos tecidos do hospedeiro, auxiliando na patogenicidade (TORTORA et al., 2000). Além disso, *sefA* está presente somente no grupo D de salmonelas, que é representado pelos sorovares Enteritidis, Moscow, Dublin e Blegdon (OCHOA et al., 2005).

Desse modo, diversos genes influenciam na patogenicidade da micro-organismo e contribuem para o aumento da severidade e ocorrência da doença. (VIEIRA, 2009). A pesquisa destes elementos têm o intuito de analisar o risco envolvido na enfermidades que envolvem o micro-organismo (OLIVEIRA, 2016).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram avaliadas 43 cepas de *Salmonella* Typhimurium isoladas de amostras de alimentos e de amostras clínicas de indivíduos com quadro de salmonelose pelo Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ), durante o período de 2011 a 2017. O IOC/FIOCRUZ também forneceu a origem, fonte de isolamento, tipo de amostra e estado de isolamento das cepas (Tabela 1).

As amostras foram encaminhadas do instituto FIOCRUZ para o Laboratório de Epidemiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (LEPIMOL-UFU) em ágar nutriente, devidamente isoladas, purificadas e sorotipadas. No LEPIMOL-UFU foi avaliada a presença de nove genes de virulência de *Salmonella*, sendo estes associados a adesão, invasão e lesão de células intestinais.

Tabela 1. Identificação e dados do isolamento das cepas de *Salmonella* Typhimurium oriundas de alimentos e indivíduos infectados no Brasil.

CEPAS	FONTE	TIPO DE AMOSTRA	ORIGEM
1	HUMANO	FEZES	RS
2	HUMANO	FEZES	RS
3	ALIMENTO	SALADA CRUA	BA
4	ALIMENTO	CARNE BOVINA RESFRIADA	RS
5	HUMANO	SANGUE	RS
6	ALIMENTO	CARNE SUÍNA	SP
7	HUMANO	FEZES	SC
8	HUMANO	FEZES	SC
9	ALIMENTO	SALADA CRUA	BA
10	HUMANO	FEZES	RS
11	ALIMENTO	SALADA DE BATATA COM MAIONESE	RS
12	ALIMENTO	PERU	RS
13	HUMANO	FEZES	RS
14	HUMANO	FEZES	RS
15	HUMANO	SANGUE	RS
16	ALIMENTO	AVES	GO
17	ALIMENTO	FILE DE PEITO	MG
18	ALIMENTO	CMS	MG
19	ALIMENTO	ORELHA SUINA	MG
20	HUMANO	FEZES	RS

21	ALIMENTO	CMS	SC
22	ALIMENTO	AVES	PR
23	ALIMENTO	LINGUIÇA SUINA	MG
24	HUMANO	FEZES	RS
25	HUMANO	FEZES	RS
26	ALIMENTO	AVES	MG
27	ALIMENTO	AVES	RS
28	ALIMENTO	FARINHA DE RESIDUOS	MG
29	HUMANO	FEZES	RS
30	HUMANO	FEZES	RS
31	ALIMENTO	SUINO CARNE CONGELADA	MT
32	ALIMENTO	SALAMINHO	RS
33	HUMANO	SEC. ABCESSO	GO
34	HUMANO	FEZES	RS
35	HUMANO	FEZES	RS
36	HUMANO	FEZES	RS
37	HUMANO	FEZES	RS
38	HUMANO	FEZES	RS
39	ALIMENTO	AVES	SC
40	ALIMENTO	PEIXE CONGELADO	MT
41	HUMANO	HUMANO	MG
42	HUMANO	SANGUE	RS
43	HUMANO	FEZES	RS

3.2 Pesquisa dos genes de virulência

Foram pesquisados nove genes de virulência: *invA*, *hila*, *avrA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *sopE*, *spvC* e *sivH*. A técnica utilizada foi a reação em cadeia da polimerase (PCR) e cada gene foi pesquisado individualmente. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando o *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega, EUA) conforme instruções do fabricante.

A amplificação para a PCR foi feita com o uso do *kit GoTaq® Green Master Mix* (Promega, EUA), adicionando o par de *primers* específicos para cada gene alvo e completadas com água ultrapura até um volume final de 25µL. Foi adicionado o DNA extraído na mistura e a reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Eppendorf®*, Alemanha).

Para amplificação dos fragmentos foi realizado a desnaturação inicial a temperatura de 94°C por 5min e a extensão final ocorreu a 72°C por 10min, sendo as condições e os números de ciclos para cada gene pesquisado adaptados a partir de estudos anteriores conforme descrito na Tabela 2. A cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076 foi utilizada como controle positivo e a água ultrapura como controle negativo, em substituição ao DNA extraído.

Posteriormente, os materiais amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (Invitrogen®, EUA) e o marcador de 100pb (Invitrogen®, EUA) como padrão de peso molecular. O gel foi corado com *Syber Safe* (Invitrogen®, EUA) e visualizado em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia®).

Tabela 2. Genes de virulência, peso molecular (pb), fator de virulência, sequência dos *primers* e referência.

GENE	PESO MOLECULAR (PB)	FATOR DE VIRULÊNCIA	PRIMER (5'→3')	REFERÊNCIA
<i>sefA</i>	488	Fímbria	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	OLIVEIRA et al., 2002.
<i>agfA</i>	350	Fímbria	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	COLLINSON et al., 1993.

<i>lpfA</i>	250	Fímbria	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	HEUZENROEDER et al., 2001.
<i>sopE</i>	398	Proteína efetora	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	PRAGER et al.,2003.
<i>avrA</i>	385	Proteína efetora	GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC	PRAGER et al.,2003.
<i>invA</i>	284	Invasão	GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	OLIVEIRA et al., 2002.
<i>hilA</i>	497	Invasão	CTGCCGAGTGTTAAGGATA CTGTCGCCTTAATCGCATGT	GUO et al., 2000.
<i>sivH</i>	763	Invasão	CAGAAATGCGAATCCTTCGCAC GTATGCGAACAAGCGTAACAC	KINGSLEY et al., 2003.
<i>spvC</i>	669	Virulência plasmidial	CGGAAATACCATCTACAAATA CCCAAACCCATACTTACTCTG	CASTILLA et al., 2006.

3.3 Análise de dados

A análise dos dados foi realizada utilizando estatística descritiva, através de cálculos percentuais. O teste exato de Fisher foi executado para avaliar as diferenças entre os perfis de virulência dispondo-se do programa GraphPad Prism, versão 7.0 (GraphPad Software, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos as 43 cepas (100%) foram positivas para os genes *invA*, *agfA*, *hilA* e *sivH*, o que evidencia o potencial virulento das cepas. A positividade do gene *lpfA* foi de 95,3% (41/43), *avrA* foi 97,6% (42/43), *spvC* 39% (17/43), *sopE* 6,9% (3/43) e do gene *sefA* 0% (0/43). Todas as amostras apresentaram pelo menos cinco genes associados, tanto nos isoladas de alimentos quanto nos de amostras clínicas humanas, demonstrando que os genes de virulência estão disseminados em diferentes ambientes.

A tabela 3 mostra a distribuição dos genes entre os isolados de alimentos e amostras clínicas. Nas amostras de alimentos foi determinado 100% (20/20) de positividade para os genes *lpfA*, *avrA*, *invA*, *agfA*, *hilA*, *sivH*. Para o gene *spvC* a positividade foi de 30% (6/20), para *sopE* apenas 5% (1/20) e o gene *sefA* não foi identificado em nenhuma das

cepas. Já nas cepas isoladas de amostras clínicas de humanos, foi determinado 100% (23/23) de positividade para os genes *invA*, *agfA*, *hilA* e *sivH*, sendo o gene *avrA* encontrado em 95,7% (22/23), o gene *lpfA* em 91,3% (21/23), *spvC* em 47,8% (11/23) e *sopE* em 8,7% (2/23), e nenhuma das cepas foi positiva para o gene *sefA*.

Tabela 3. Presença de genes de virulência em *S. Typhimurium* isoladas de alimentos e amostras clínicas de humanos

GENE	HUMANOS	ALIMENTOS	TOTAL (%)	TESTE EXATO DE FISHER
<i>sefA</i>	0/23	0/20	0% (0/43)	p>0,99
<i>lpfA</i>	21/23	20/20	95,3% (41/43)	p=0,49
<i>avrA</i>	22/23	20/20	97,6% (42/43)	p>0,99
<i>invA</i>	23/23	20/20	100% (43/43)	p>0,99
<i>agfA</i>	23/23	20/20	100% (43/43)	p>0,99
<i>sopE</i>	02//23	1//20	6,9% (3/43)	p>0,99
<i>hilA</i>	23/23	20/20	100% (43/43)	p>0,99
<i>sivH</i>	23/23	20/20	100% (43/43)	p>0,99
<i>spvC</i>	11//23	6//20	39,5% (17/43)	p=0,35

Foi possível traçar cinco perfis de virulência (tabela 4). O perfil P1 incluiu sete dos nove genes analisados, *lpfA*, *avrA*, *invA*, *agfA*, *sopE*, *hilA* e *sivH*. Esse perfil representou 6,9% (3/43) das cepas, sendo 2/23 (8,6%) isoladas de amostras clínicas de humanos e 1/20 (5%) de alimentos.

O gene *sopE*, que foi positivo apenas no perfil P1, é um dos responsáveis pela invasão celular, induzindo alterações na membrana e citoesqueleto da célula (RAHMAN et al., 2004). Este gene já foi descrito em isolados de diferentes origens com ocorrência de 86 % (RAHMAN et al., 2005). Apesar do pequeno número de cepas que apresentaram esse perfil neste estudo, o resultado é relevante para a saúde pública, já que em caso de infecção e expressão de todos os genes, é provável o desencadeamento de episódios mais graves de salmonelose.

O perfil que apresentou maior prevalência foi o P2, composto pelos genes *lpfA*, *avrA*, *invA*, *agfA*, *hilA* *sivH*, *spvC*, representando 48,8% (21/43) do total de cepas, sendo que dessas, 13/20 (65%) foram isoladas de alimentos e 8/23 (34,7%) de amostras clínicas de humanos. O padrões P3 (2,3%) e P5 (4,6%) foram os menos encontrados e identificados apenas em isolados de amostras clínicas. O perfil P4 foi o segundo mais frequente, incluindo 16/43 (37,2%) cepas e destaca-se como o de maior prevalência entre

os isolados de amostras humanas (10/23 - 43,4%).

Tabela 4. Perfis obtidos através dos resultados de presença ou ausência dos genes

PERFIS DE VIRULÊNCIA	HUMANO N=23	ALIMENTO N=20	N=43
P1: <i>lpfA, avrA, invA, agfA, sopE, hilA, sivH</i>	2 (8,6%)	1 (5,0%)	3 (6,9%)
P2: <i>lpfA, avrA, invA, agfA, hilA, sivH, spvC</i>	8 (34,7%)	13 (65,0%)	21 (48,8%)
P3: <i>lpfA, invA, agfA, hilA, sivH, spvC</i>	1 (4,3%)	0 (0%)	1 (2,3%)
P4: <i>lpfA, avrA, invA, agfA, hilA, sivH</i>	10 (43,4%)	6 (30,0%)	16 (37,2%)
P5: <i>avrA, invA, agfA, hilA, sivH</i>	2 (8,6%)	0 (0,0%)	2 (4,6%)
TOTAL	23 (100%)	20 (100%)	43 (100%)

O *hilA* é um dos genes utilizados para identificação do gênero *Salmonella* spp (BORGES et al., 2013) e foi identificado em todos as cepas analisadas. O gene *sivH* também foi identificado em todas os isolados, e isso concorda com outros estudos (BORGES et al., 2013; KINGSLEY et al., 2013); este gene é relacionado à cepas mais patogênicas (BORGES et al., 2013).

O gene *sefA* não foi identificado em nenhum dos isolados, resultado já esperado, uma vez que esse gene está localizado no operon *sefABCDE*, que é exclusivo dos sorovares Enteritidis, Moscow, Dublin e Blegdon (OCHOA et al., 2005). Apesar disso, é importante seu monitoramento, considerando que pode haver transferência horizontal de genes por recombinação.

O gene *spvC* é associado a bacteremia (MKANGARA et al., 2019) e esteve presente nos perfis de virulência P2 e P3. É um gene plasmidial associados a alguns sorovares de *Salmonella* como Enteritidis, Typhimurim, Pullorum e Gallinarum (PAL et al., 2017; LAN et al., 2018). Já o gene *agfA* participa na formação de biofilmes e adesão em mucosas (YOO et al., 2013). Weber et al. (2019) determinaram sua presença em todas amostras analisadas, concordando com os resultados deste estudo, onde 100% das cepas foram positivas para o gene.

Não foi possível a associação epidemiológica entre os perfis de virulência em relação ao tipo de amostra da qual foram isolados ou local de isolamento, impossibilitando a associação entre rotas de contaminação ou contaminação cruzada. Porém, deve-se ressaltar a importância dos perfis identificados e seu potencial patogênico, o que instiga ao uso de outras técnicas para avaliar a associação, como a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), tipagem

de sequência multilocus ou sequenciamento gênico (URWIN et al., 2003; SHARMA-KUINKEL et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

O conjunto de genes identificados em *S. Typhimurium* demonstrou a presença de cinco perfis de virulência, com no mínimo cinco genes associados, demonstrando o potencial patogênico das cepas isoladas de humanos e alimentos. A diversidade dos locais de isolamento e amostras de que foram obtidas não permitiu estabelecer a relação epidemiológica entre os isolados..

REFERÊNCIAS

- ALVES, F. S. F.; PINHEIRO, R.R. **Potencial de transmissão de enfermidades pela carne, leite e derivados de caprinos e ovinos.** Artmed, Porto Alegre. 2016.
- BEN-BARAK Z.; STRECKEL W.; YARONA S.; COHENC S.; PRAGER R.; TSCHAPE H. The expression of the virulence-associated effector protein gene *avrA* is dependent on a *Salmonella* enterica-specific regulatory function. **Int J Med Microbiol.** 2006.
- BORGES K.A.; FURIAN T.Q.; BORSOI A.; MORAES H.L.S.; SALLE C.T.P.; NASCIMENTO V.P. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** 2013.
- BRASIL. **Ministério da Saúde.** 2011. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. 3. ed. Brasília.
- BRASIL. **Ministério da Saúde.** 2018. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil.
Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/maio/17/Apresentacao-SurtosDTA-Maio-2019.pdf>. Acesso em 10 out. 2019.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2019. **Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019.** Atlanta, USA. Disponível em:
<<http://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2019-508.pdf>> Acesso em: 19 ago 2019.
- CRĂCIUNAȘ, C., et. al. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hlyA*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. **J. Environ. Manage.** 2012.
- DARWIN K.H.; MILLER V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clin Microbiol Rev.** 1999;12: 405-28.
- DIAS, R. S., Leal-Bernardes, A. F. & Zuccoli, P. C. 2011. A importância do processo de investigação na elucidação de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, 1, 17-23.
- DIAS, R. S., Leal-Bernardes, A. F. & Zuccoli, P. C. A importância do processo de investigação na elucidação de surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). **Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, 2011.
- EFSA **European Food Safety Authority** Casos de *Salmonella* em humanos: avaliação dos atuais objetivos de redução da UE, 2019. Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/190218>. Acesso em 15 set 2019.
- ELEMFAREJI OI, Thong KL. Comparative virulotyping of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*. **Indian Journal Microbiology**, v.53, p.410–417, 2013.

FERRAZ, R. R. N., Santana, F. T., Barnabé, A. S. & Fornari, J. V. 2015. Investigação de surtos de doenças transmitidas por alimentos como ferramenta de gestão em saúde de unidades de alimentação e nutrição. **Revista de Administração e Ciências Contábeis do IDEAU**, 2015.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. Salmonella. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, p. 329-338. 2008.

FINSTAD, S. et al., Salmonella and broiler production in the United states: relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research Internacional**, v. 45, n.2, p. 789-794,2012.

FLORES, A. M. P. C.; MELO, C. B. **Principais bactérias causadoras de doenças de origem alimentar**. 2013. 8 p. Pós graduação (Medicina Veterinária)- Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCA), Universidade de Brasília, Brasília DF, 2014.

FORSYTHE, S. J.. Microbiologia da segurança dos alimentos. **Artmed**, Porto Alegre. 2013.

GIBSON D.L., *et al.*. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis. **Salmonella Enteritidis. Microbiology**. 2007

HAVELAAR, A. H., Kirk, M. D., Torgerson, P. R., Gibb, H. J., Hald, T., Lake, R. J., Praet, N., Bellinger, D. C., de Silva, N. R., Gargouri, N., Speybroeck, N., Cawthorne, A., Mathers, C., Stein, C., Angulo, F. J., & Devleesschauwer, B. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010. **PLoS Medicine**, 12, e1001923. (2015).

HUR, J., Kim, J. H., Park, J. H., Lee, Y. J., & Lee, J. H. . Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant Salmonella Enteritidis strains isolated from poultry. **The Veterinary Journal**,189(3), 306-311(2011).

KINGSLEY R.A., *et. al.*. Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of Salmonella enterica serotype Typhimurium: Identification of intestinal colonization and persistence determinants. **Infect Immun**. 2003..

LAN TTQ, Gaucher ML, Nhan NTM, Letellier A, Quessy S. Distribution of Virulence Genes among Salmonella Serotypes Isolated from Pigs in Southern Vietnam. **J Food Prot**. 2018 Sep;81(9):1459-1466. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-17-408. PMID: 30084656.

MENDONÇA, Eliane Pereira. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de Salmonella com impacto na saúde pública,isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016.

MIRMOMENI MH, Kiani S, Sisakhtnezhad S. Rapid detection of Salmonella Dublin by PCR amplification of the sopE gene and its cloning. **Pak J Biol Sci**. 11: 1497-1501. 2008.

MKANGARA M, Mbega ER, Chacha M. Molecular identification of *Salmonella* Typhimurium from village chickens based on *invA* and *spvC* genes. **Vet World**. 2019 Apr;13(4):764-767. doi: 10.14202/vetworld.2020.764-767. Epub 2020 Apr 23. PMID: 32546923; PMCID: PMC7245706.

MORROW, W. E. M. & FUNK, J. *Salmonella* as a foodborne pathogen in pork. **Animal Science Facts**, Proceedings of the Third International Symposium on the Epidemiology and Control of *Salmonella* in Pork. Washington, D.C., 1999.

OCHOA, I. M. F.; RODRIGUEZ, A.V. **Mecanismos moleculares de patogenicidade**, 2005.

OLIVEIRA, et. al.. **Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão**. HCPA, 30, 279-285, 2010.

PAL, Susmita et al. Caracterização de isolados de *Salmonella* Gallinarum de aves de criatório de quintal pela reação de polimerase em cadeia de detecção de genes de invasão (*invA*) e de virulência plasmidial de *Salmonella* (*spvC*). **Mundo veterinário**, 10.7: 814, 2017.

PINHEIRO, N.; SARTORI, G. V.; RIBEIRO, A. B. **CONTROLE DE QUALIDADE MICROBIOLÓGICO NA CADEIA DE ABATE DE BOVINOS**. 2016. 12 p. Faculdade Integrado de Campo Mourão, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016.

RAHN, K. et al. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. **Molecular and Cellular Probes**, 6, 271-279. (1992).

RAHMAN H, Hardt WD, Murugkar HV, Bhattacharyya DK. Occurrence of *sopE* gene and its phenotypic expression among different serovars of *Salmonella* enterica isolated from man and animals. **Indian J Exp Biol**. 2005 Jul;43(7):631-4. PMID: 16053270.

RAHMAN H, Streckel W, Prager R, Tschape H. Presence of *sopE* gene & its phenotypic expression among different serovars of *Salmonella* isolated from man & animals. **Indian J Med Res**. 2004 Jul;120(1):35-8. PMID: 15299230.

ROSE, N.; BEAUDEAUB, F., DROUINA, P.; TOUXA, J. Y.; ROSEA, V.; COLIN, P. Risk factors for *Salmonella* enterica subsp. Enteric contamination in French broiler-chicken flocks at the end of the rearing period. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 39, p.265-277, 1999.

CARDOSO, A. L.S. P. & TESSARI E. N.C.. *Salmonella* sp. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.11, n.21, 2013. Disponível em: http://www.revmedvet.com/pdfs/revmedvet/mi-2013/mi05-1_2e.pdf. Acesso em 10 set. 2019.

SINAN/SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE/MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2008. **Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por**

Alimentos no Brasil. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_.pdf. Acesso em 10 set 2019.

SHARMA-KUINKEL, BK, Rude, TH, & Fowler, VG, Jr (2016). Eletroforese em gel de campo de pulso. **Methods in molecular biology (Clifton, NJ)**, 1373, 117- 130. https://doi.org/10.1007/7651_2014_191

SHINOHARA, N. K. S. et. al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, p.1675-1683, 2008.

SILVA, F.F.P. **Investigação de Salmonella spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouro-frigorífico.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SUEZ J, et al. Virulence gene profiling and pathogenicity characterization of non-typhoidal Salmonella accounted for invasive disease in humans. **PLoS ONE**. 2013.

Urwin R, Maiden MC. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trend Microbiology**. 2003 Oct;11(10):478-87.

VIEIRA, M. A. M.. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, 33. 2009.

WEBBER B, et al. Detection of virulence genes in Salmonella Heidelberg isolated from chicken carcasses. **Rev Inst Med Trop**. São Paulo. 2019.

WHANG, X. et. al. Antibiotic Resistance in Salmonella Typhimurium Isolates Recovered From the Food Chain Through National Antimicrobial Resistance Monitoring System Between 1996 and 2016. **Front Microbiol**. 2019.

WHITE, D. G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T. C. The National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). **NMC Annual Meeting Proceedings**, Florida. 2006

WILKINS, W. et al. Comparison of Bacterial Culture and Real-Time PCR for the Detection of Salmonella in Grow–Finish Pigs in Western Canada Using a Bayesian Approach. **Zoonoses and public health**, v. 57, n. s1, p. 115-120,2010.

YAN S.S., et. al. . An overview of Salmonella typing: Public health perspectives. **Clin Applied Immunol**. 2003.

YOO, A.Y., Yu, J.E., Yoo, H., Lee, T.H., Lee, W.H., Oha, J.I., Kang, H.Y., 2013. Role of sigma factor E in regulation of Salmonella Agf expression. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 430, 131–136. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.025>.