

CRISTINA SOFIA GOMES CALEJA

**Detecção de *Salmonella* sp., estudo serológico
e perfil de resistências a antibióticos em
animais selvagens e domésticos em Portugal**

Dissertação de Mestrado em Análises Laboratoriais

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Poeta

Co-Orientadora: Professora Doutora Madalena Vieira-Pinto



**Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro
VILA REAL, 2010**

Orientador científico: _____

Professora Doutora Patrícia Poeta
(Professora-Auxiliar; DCV/UTAD)

Co-Orientador científico : _____

Professora Doutora Madalena Vieira- Pinto
(Professora-Auxiliar; DCV/UTAD)

*Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.*

*Lêe quanto és
No mínimo que fazes.*

*Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive*

(Ricardo Reis)

*À minha mãe por me ajudar a concretizar os meus sonhos.
A ti meu amor, por estares sempre aqui e me mostrares que tudo é possível.*

Agradecimentos

No final desta dissertação, desejo manifestar o meu sincero agradecimento às várias pessoas que me ajudaram a tornar este projecto possível. A todos gostaria de deixar, aqui registado, este simples mas sincero agradecimento.

À Professora Doutora Patrícia Poeta, por aceitar ser orientadora deste trabalho e me transmitir os seus ensinamentos. Pelo apoio, compreensão, carinho, disponibilidade e interesse que sempre demonstrou ao longo de todo este trabalho.

À Professora Doutora Madalena Vieira-Pinto por ter aceite ser co-orientadora nesta investigação, pela sua orientação científica e incansável apoio e estímulo. E pela preciosa ajuda no isolamento de *Salmonella* sp.

À Professora Doutora Carmen Torres por me ter recebido de braços abertos na sua equipa, fazendo-me sentir completamente “em casa” num cidade estrangeira e completamente nova. Pela sua simpatia, alegria, apoio e confiança. Obrigada pela oportunidade única e tão enriquecedora quer a nível profissional como pessoal.

Ao Professor Doutor Gilberto Igrejas, por todo o apoio e disponibilidade que sempre teve comigo.

À dona Ana Leite, ao Sr. Felisberto Borges e à Luísa Morais, pelo companheirismo, amizade e ajuda durante a fase de isolamento de *Salmonella* sp.

A todas as funcionárias que integram o laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Veterinárias pela ajuda e disponibilidade que sempre tiveram quando foi necessário.

A todos os meus colegas de laboratório por toda a ajuda durante o estudo de sensibilidade a antibióticos.

Aos meus colegas do laboratório na Universidade de La Rioja, em Espanha pelo companheirismo, hospitalidade, integração e pelo bom ambiente de trabalho. Um

agradecimento especial para o Carlos e a Catarina que sempre me apoiaram e ajudaram, pelo carinho e amizade. E por me terem mostrado Logroño fora do laboratório.

À minha mãe por toda a força e confiança que sempre me transmitiu e por estar presente em mais uma etapa. Sem ela sei que teria sido muito mais difícil!

A toda a minha família que sempre me apoiou e ajudou de uma forma directa ou indirecta.

Ao Sérgio pela confiança, apoio e, pelo amor e carinho incondicional. Por me demonstrar um mundo colorido sempre que eu o via a preto e branco. Adoro-te hoje e sempre!

A todos os meus colegas de licenciatura e de mestrado com quem tive o privilégio de partilhar estes meus anos académicos. Em especial à Catarina, Luciana e Vânia companheiras e Amigas em todos os momentos.

À Rita e à Ticha, amigas e colegas de apartamento. Obrigada pela amizade, apoio e por todos os grandes momentos que passamos juntas.

Finalmente a todos aqueles que não especificando, me incentivaram e ajudaram no decorrer deste trabalho.

TRABALHOS CIENTÍFICOS PRODUZIDOS NO ÂMBITO DA TESE

Publicações de artigos em revistas científicas:

- ✚ L. Pinto, P. Poeta, S. Vieira, **C. Caleja**, H. Radhouani, C. Carvalho, M. Vieira-Pinto, P. Themudo, C. Torres, R. Vitorino, P. Domingues and G. Igrejas. 2010. Genomic and proteomic evaluation of antibiotic resistance in *Salmonella* strains. *Journal of proteomics*. 10. 1016.

Publicações de artigos em revistas científicas:

- ✚ **Caleja C.**, Gonçalves A., Themudo P., Vieira-Pinto M., Monteiro D., Rodrigues J., Sáenz Y., Igrejas G., Torres C., Poeta P. 2010. Detection of *Salmonella enterica* and characterization of antibiotic resistance in fecal samples of wild boars and bísaro pigs in Portugal. *Foodborne Pathogens and Disease*.

Publicações em actas de encontros científicos decorrentes da comunicação oral:

- ✚ **C. Caleja**, L. Morais, A. Gonçalves, P. Themudo, M. Vieira-Pinto, C. Martins, D. Monteiro, J. Rodrigues, E. Ruiz, G. Igrejas, P. Poeta and C. Torres. “Biodiversidade genética de resistência à estreptomicina e tetraciclina em *Salmonella* sp. isoladas de animais”. 2^{as} Jornadas de Biologia (7 a 8 de Outubro de 2008 - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).

Publicações em actas de encontros científicos decorrentes da comunicação em painel:

- ✚ M. Vieira-Pinto, L. Morais, **C. Caleja**, P. Themudo, D. Monteiro, J. Aranha, C. Torres, G. Igrejas, P. Poeta and C. Martins. “*Salmonella* spp. in wild board (*Sus scrofa*). A public and animal health concern.” (18 e 19 de Junho de 2009 - International Conference “Game Meat Hygiene in Focus”, Universidade de Veterinária e Ciências Farmacêuticas, Brno (UVPS), Republica Checa).
- ✚ H. Radhouani, A. Gonçalves, S. Ramos, L. Pinto, C. Coelho, **C. Caleja**, A. Barreto, A. Brandão, B. Guimarães, C. Carneiro, C. Araújo, I. Moura, N. Figueiredo, S. Pinheiro, T. Almeida, C. Gomes, S. Vieira, J. Vaz, J. Façanha, M. Vicente, E. Bastos, C. Carvalho, F. Ruiz-Larrea, C. Torres, P. Domingues,

R. Vitorino, P. Martins-Costa, M. Hébraud, L. Izarra, J. Rodrigues, P. Poeta and G. Igrejas. “Genomic and proteomic analysis applied to antibiotic resistance evaluation from human and animal bacterial strains”. 1st Meeting of the Institute for Biotechnology and Bioengineering. (15 e 16 de Maio 2009 - Universidade do Algarve, Faro).

- ✚ **C. Caleja**, A. Gonçalves, P. Themudo, M. Vieira-Pinto, D. Monteiro, J. Rodrigues, C. Torres, G. Igrejas and P. Poeta. “O porco bísaro como reservatório de serótipos de *Salmonella* sp. resistentes a agentes antimicrobianos”. XVIII Congresso de Zootecnia (6 a 9 de Maio de 2009 - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).
- ✚ S. Vieira, L. Pinto, **C. Caleja**, C. Coelho, M. Vieira-Pinto, C. Carvalho, F. Ruiz-Larrea, C. Torres, P. Domingues, P. Poeta and G. Igrejas. “Análise proteómica em *Salmonella* e *Staphylococcus* através de electroforese mono e bidimensional”. 1^{as} Jornadas Nacionais de Genética e Biotecnologia (21 a 23 de Novembro de 2008 - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).
- ✚ **C. Caleja**, L. Morais, A. Gonçalves, P. Themudo, M. Vieira-Pinto, C. Martins, D. Monteiro, J. Rodrigues, L. Vinué, G. Igrejas, P. Poeta and C. Torres. “Biodiversidade de serótipos de *Salmonella* sp. de diferentes origens animais de distintos perfis de resistência a antibióticos”. 11^o Encontro Nacional de Ecologia (20 a 22 de Novembro de 2008 - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).
- ✚ **C. Caleja**, L. Pinto, S. Vieira, M. Vieira-Pinto, C. Carvalho, F. Ruiz-Larrea, C. Torres, P. Poeta and G. Igrejas. “Análise proteómica associada à resistência a antibióticos em *Salmonella* spp. de animais selvagens”. 2^{as} Jornadas de Biologia (7 e 8 de Outubro de 2008 - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).

- ✚ **C. Caleja**, L. Morais, A. Gonçalves, P. Themudo, M. Vieira-Pinto, C. Martins, D. Monteiro, J. Rodrigues, Y. Sáenz, C. Carvalho, G. Igrejas, C. Torres and P. Poeta. “Detecção genética do gene *sul1* em *Salmonella* Rissen, S. Typhimurium e S. Enteritidis resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim em javalis e porco bísaro”. Moçambique (Outubro de 2008).

- ✚ **C. Caleja**, L. Morais, A Gonçalves, P. Themudo, G. Igrejas, M. Vieira-Pinto, C. Martins, J. Rodrigues, C. Torres and P. Poeta. “Resistência a antibióticos em *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Rissen* isoladas de javali. Um problema de saúde pública”. II Congresso Português de fauna selvagem – Waves Portugal (23 a 25 de Maio de 2008 - Mogadouro) e Jornadas de Ciência Alimentar (Maio de 2008 - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).

- ✚ **C. Caleja**, N. Figueiredo, A. Gonçalves, G. Igrejas, P. Themudo, M. Vieira-Pinto, C. Martins, J. Rodrigues, C. Torres and P. Poeta. “O coelho selvagem como portador de *Salmonella* sp. com fenótipos de multirresistência aos antibióticos”. II Congresso Português de fauna selvagem – Waves Portugal (23 a 25 de Maio de 2008 -Mogadouro) e Jornadas de Ciência Alimentar (Maio de 2008 - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).

- ✚ **Caleja C.**, Morais, L., Gonçalves, A., Themudo, P., Igrejas, G., Vieira-Pinto, M., Rodrigues, R., Torres, C. and Poeta, P. “A segurança alimentar em caça: resistência aos antibióticos em *Salmonella* sp. isolada de javali”. I Jornadas de Ciência Alimentar. (16 de Maio de 2008 – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).

- ✚ **Caleja, C.**, Figueiredo, N., Gonçalves, A., Igrejas, G., Themudo, P., Vieira-Pinto, M., Rodrigues, R., Torres, C. and Poeta, P. “A segurança alimentar em caça: resistência aos antibióticos em *Salmonella* sp. isolada de coelho selvagem”. I Jornadas de Ciência Alimentar. (16 de Maio de 2008 – Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real).

Detecção de *Salmonella*, estudo serológico e perfil de resistências a antibióticos em animais selvagens e domésticos em Portugal

Resumo

Nos últimos anos, observou-se um rápido e preocupante aumento da resistência aos antibióticos e a emergência de estirpes multirresistentes de *Salmonella* sp. isoladas em animais e humanos. Tal facto, torna-se ainda mais preocupante pela sua associação a uma grande biodiversidade de serótipos.

Este trabalho teve 5 objectivos principais: isolamento de *Salmonella* sp. de amostras de diferentes origens, serotipificação, determinação da resistência a diferentes antibióticos, detecção dos genes responsáveis por essas mesmas resistências e, avaliar os perfis proteicos obtidos a partir de análise proteómica. No entanto, a concretização desta investigação só foi possível graças a uma cooperação entre, a Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (Vila Real, Portugal) e a Universidade de La Rioja (Logroño, Espanha)

Nesta investigação, foram analisadas 243 amostras fecais de diferentes animais. Assim, a partir de 77 amostras fecais de javali, 77 amostras fecais de coelho selvagem, 35 amostras fecais de porco bísaro e 54 amostras fecais de avestruz procedeu-se ao isolamento de *Salmonella* sp. através do método descrito no anexo D da norma ISO 6579:2002. De seguida, foram isoladas e serotipificadas as várias colónias e estudada a susceptibilidade a 16 antibióticos diferentes de acordo com as normas do CLSI. De acordo com o fenótipo de resistência detectado, foi utilizada a técnica de PCR para testar os vários genes responsáveis por essas mesmas resistências. Finalmente, extraíram-se as proteínas totais de 14 estirpes de *Salmonella* com origem, serótipo e perfil de resistência aos antibióticos distintos e, de seguida procedeu-se à técnica de electroforese SDS-PAGE.

A detecção de *Salmonella* foi detectada em maior percentagem (85,7%) nos isolados de porco bísaro. Para os isolados de coelho selvagem e javali, a detecção de *Salmonella* foi verificada em 49,4% e 22,1%, respectivamente. Pelo contrário, as amostras de avestruz apresentaram uma percentagem de positividade muito baixa de 5,56%. Relativamente à serotipificação, foram detectados 5 serótipos diferentes sendo os

serótipos *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Rissen os detectados em maior percentagem e presente em todas as diferentes origens.

Apesar da inexistência de estirpes produtoras de β -lactamases de amplo espectro a maioria demonstrou resistência à ampicilina, tetraciclina e estreptomicina. Foi possível estabelecer uma relação entre o serótipo e a resistência a determinados antibióticos. Verificou-se que os isolados pertencentes ao serótipo *S.* Typhimurium apresentaram sempre resistência á ampicilina e cloranfenicol. Por sua vez, o serótipo *S.* Rissen apresentou sempre resistência à tetraciclina embora nunca ao cloranfenicol. A resistência ao ácido nalidíxico esteve sempre presente no serótipo *S.* Enteritidis.

Recorreu-se à técnica de PCR para a caracterização de diferentes genes: *tetA* e *tetB* nos isolados com resistência à tetraciclina, *aadA* para os isolados que apresentavam resistência à estreptomicina e *sul1* nas amostras resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim. Nenhum dos isolados com resistência à tetraciclina apresentou o gene *tetB* e, apenas os pertencentes ao serótipo *S.* Rissen apresentaram o gene *tetA*. Por sua vez, 63,8 % dos isolados com resistência à estreptomicina apresentaram o gene *aadA*. Finalmente, o gene *sul1* foi verificado em 60,6% dos isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim.

Relativamente ao estudo dos integrões, nenhum isolados apresentou o Int-2 no entanto o Int-1 foi detectado em 75,8% dos isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim. Verificou-se ainda, que os isolados que apresentaram integrões possuem resistência a vários antibióticos.

As evidências dos resultados do SDS-PAGE revelaram perfis proteicos distintos consoante as resistências estudadas. De facto, os resultados preliminares da avaliação do proteoma destas estirpes sugerem a possibilidade de algumas comparações através da electroforese bidimensional do tipo IEFxSDS-PAGE e a sua identificação através de espectrometria de massa com recurso à bioinformática.

Estes resultados são preocupantes uma vez que, a maioria destes animais não estão expostos directamente a estes antibióticos, tendo sido possível, no entanto, isolar serótipos multirresistentes. Assim, é importante continuar a aperfeiçoar os sistemas de vigilância epidemiológica, para desta forma contribuir para uma melhor identificação, caracterização e combate de doenças infecciosas e o aumento da taxa de resistência.

Palavras chave: *Salmonella* sp., javali, porco bísaro, coelho bravo, avestruz resistência a antibióticos.

Índice geral

Preâmbulo	2
Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica	3
1.1. Introdução	3
1.1.1. O género <i>Salmonella</i>	3
1.1.2. O papel de <i>Salmonella</i> sp. nas doenças de origem alimentar	7
1.1.3. Métodos de detecção de <i>Salmonella</i> sp.	9
1.2. A técnica de Reacção em Cadeia pela Polimerase (PCR)	11
1.3. Os antibióticos	14
1.3.1. Descrição e Classificação	14
1.3.2. Impacto do uso de antibióticos	16
1.3.3. As alternativas actuais	17
1.4. A resistência bacteriana aos antibióticos e sua importância em saúde humana e animal	18
1.5. Elementos genéticos responsáveis pela dispersão de genes de resistência .	
1.5.1. Plasmídeos	23
1.5.2. Transposões	24
1.5.3. Integrões	25
Capítulo 2 – Objectivos	28
Capítulo 3 - Material e Métodos	29
3.1. Amostras fecais	29
3.2. Meios de cultura e provas de identificação utilizadas para o isolamento ..	29
3.3. Isolamento de estirpes de <i>Salmonella</i> sp.	29
3.4. Identificação fenotípica das bactérias	30
3.5. Determinação da sensibilidade a antibióticos	31
3.6. Extracção de DNA	33
3.7. Quantificação de DNA.....	34
3.8. Reacção em cadeia pela polimerase (PCR)	34
3.9. Electroforese em gel de agarose	30
3.10. Análise proteómica	39

Capítulo 4 – Resultados	42
Capítulo 5 – Discussão	57
Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas	64
Capítulo 7 - Referências Bibliográficas	66
Anexos	84

Índice das Figuras

Figura 1 – Bactéria do género <i>Salmonella</i> vista por microscopia electrónica.....	3
Figura 2 - Diagrama ilustrativo da sequência de passos necessários para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp. descrito na Norma 6579:2002	10
Figura 3 – Esquema representativo da reacção de PCR	13
Figura 4 – Diagrama representativo de um plasmídeo	24
Figura 5 – Representação esquemática da estrutura geral dos integrões	25
Figura 6 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos genes <i>blaOXA</i>	51
Figura 7 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos genes <i>aac</i> (3’)-I e <i>aac</i> (3’)-II	52
Figura 8 – Gel de SDS-PAGE dos extractos proteicos totais de <i>Salmonella</i> sp.	55

Índice dos gráficos

Gráfico 1 – Distribuição dos serótipos pelos isolados de diferentes origens	43
Gráfico 2 – Serótipos detectados nos isolados de Javali	44
Gráfico 3 – Serótipos detectados nos isolados de Porco Bísaro	44
Gráfico 4 – Serótipos detectados nos isolados de Coelho Selvagem	45

Índice das Tabelas

Tabela 1 – Número de serótipos das espécies de <i>Salmonella enterica</i> e <i>Salmonella bongori</i>	5
Tabela 2 – Características diferenciais das espécies e subespécies de <i>Salmonella</i> sp. ...	6
Tabela 3 - Carga dos discos de antibióticos usados nos antibiogramas e “Break-points” dos halos de inibição, utilizados no presente estudo (CLSI, 2007)	32
Tabela 4 - Componentes usados na técnica de PCR	34
Tabela 5 – <i>Primers</i> utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes codificantes de β -lactamases	35
Tabela 6 – <i>Primers</i> utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes resistência relacionados com a resistência ao cloranfenicol	36
Tabela 7 – <i>Primers</i> utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes resistência relacionados com a resistência a tetraciclina	36
Tabela 8 – <i>Primers</i> utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes resistência relacionados com aminoglicósidos	37
Tabela 9 – <i>Primers</i> utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes resistência relacionados com a resistência ao sulfametoxazol ..	37
Tabela 10 – <i>Primers</i> utilizados e condições utilizadas para o estudo de integroes	38
Tabela 11 – Preparação dos géis de separação	40
Tabela 12 – Preparação dos géis de concentração	41

Tabela 13 – Nº de amostras de amostras fecais analisadas e positivas e respectiva % de positividade para cada uma das origens analisadas	42
Tabela 14 – Resistências a antibióticos detectadas nos isolados de javali	46
Tabela 15 – Resistências a antibióticos detectadas nos isolados de porco bísaro	47
Tabela 16 – Resistências a antibióticos nos isolados de coelho selvagem	48
Tabela 17 – Resistências a antibióticos detectadas nos isolados de avestruz	48
Tabela 18 – Fenótipos de resistência a antibióticos detectados e a relação com os serótipos de <i>Salmonella</i> e a origem dos isolados	50
Tabela 19 – Relação entre a resistência à tetraciclina e a presença dos genes <i>tetA</i> e <i>tetB</i>	52
Tabela 20 – Relação entre a resistência à estreptomicina e a presença do gene <i>aadA</i> ..	53
Tabela 21 – Relação entre a resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim e a presença dos genes <i>sul1</i> e <i>qacEΔ1</i>	53
Tabela 22 – Relação entre a resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim e a presença do integrão 1 e o tipo de região variável	54
Tabela 23 – Perfis de resistência de <i>Salmonella</i> sp. das amostras estudada	55

Lista de Abreviaturas e Símbolos Utilizados no Texto

AK – Amicacina.

AMC – Amoxicilina + ácido clavulânico.

AMP – Ampicilina.

APT – Água Peptonada Tamponada (“BPW – Buffered Peptone Water”).

a_w – Atividade da água

AZT – Aztreonam.

BHI – Infusão de cérebro e coração (“Brain-Heart Infusion”).

CAT – Cloranfenicol acetil transferases

CAZ – Ceftazidima.

CEE – Comunidade Económica Europeia.

CHL – Cloranfenicol.

CIP – Ciprofloxacina.

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute.

CoA – Coenzima A

CTX – Cefotaxima.

°C – Graus Celsius

DNA - Ácido desoxirribonucleico (“Deoxyribonucleic Acid”).

dNTP – Deoxinucleotídeo trifosfato.

g – grama.

GEN – Gentamicina.

I – Sensibilidade intermédia.

IMP – Imipenemo.

LNIV – Laboratório Nacional de Investigação Veterinária.

mg - Miligrama.

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio.

MH – Mueller-Hinton.

min. – Minuto.

ml – Mililitro.

mm – Milímetro.

MSRV - Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis.

NAL – Ácido nalidixico.

PBP – Proteínas fixadoras da penicilina (“*Penicilin Binding Proteins*”).

PBS – Tampão salino fosfato.

PCR – Reacção em cadeia pela polimerase (“Polimerase Chain Reaction”).

pb – Pares de bases.

R – Resistente.

rpm – rotações por minuto.

S – Sensível.

S. – *Salmonella*

SDS – Dodecil sulfato de sódio (“Sodium Dodecyl Sulfate”).

SDS-PAGE – Electroforese em gel de poliacrilamida na presença do dodecil sulfato de sódio (“Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis”).

seg. – Segundo.

SRT – Estreptomicina.

SXT – Trimetoprim-sulfametoxazol.

Taq-polimerase – *Thermus aquaticus*-polimerase.

TBE – Tris-borate-EDTA

TCA – ácido tricloroacético

TET – Tetraciclina.

TET – Tetraciclina.

TOB – Tobramicina.

TSI – Triple Sugar Iron.

µl - Microlitro.

UR – Universidade de La Rioja.

UTAD - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

UV - Ultra Violeta.

V – Volts.

W – Watt.

XLD - Xilose Lysine Desoxycholate.

%— Percentagem.

Preâmbulo

Este trabalho encontra-se estruturado em sete capítulos os quais se passam, sumariamente, a descrever.

A tese inicia-se com uma revisão bibliográfica com a informação que suportou o trabalho de investigação. Assim no capítulo 1, começa-se por descrever o género *Salmonella* referindo as suas características gerais, a sua importância clínica e ainda, os métodos de detecção. Em seguida, apresenta-se uma breve descrição da Reacção em Cadeia pela Polimerase (PCR), utilizada neste trabalho, referindo as suas vantagens e desvantagens. Depois descrevem-se e classificam-se os antibióticos, descrevendo-se o impacto do seu uso e as possíveis alternativas. Segue-se a explicação sobre a resistência bacteriana aos antibióticos e sobre os mecanismos bioquímicos dessas resistências. Finalmente, na última parte deste capítulo são referidos e descritos três elementos genéticos responsáveis pela dispersão de genes de resistência: os plasmídeos, os elementos genéticos transponíveis e os integrões.

No capítulo 2, são apresentados os objectivos propostos a alcançar com a realização desta investigação.

O terceiro capítulo, é referente à componente prática, onde se encontram descritas todas as etapas do desenvolvimento experimental. Primeiramente descreve-se as amostras e a sua proveniência, e as técnicas utilizadas para isolar e serotipificar *Salmonella* sp., para determinar a sensibilidade a antibióticos, para a análise de genes responsáveis pelas resistências e, para a análise proteómica.

No capítulo 4, são apresentados e descritos todos os resultados obtidos ao longo de todo o trabalho.

O capítulo 5, é dedicado à discussão dos resultados obtidos ao longo do trabalho experimental. Neste capítulo os resultados do nosso trabalho são comparados com os obtidos em investigações semelhantes, e as semelhanças e diferenças entre os trabalhos são analisadas e explicadas.

A conclusão final deste trabalho e a análise das perspectivas futuras, apresenta-se no capítulo 6.

Finalmente, o trabalho termina no capítulo 7, com a apresentação de toda a bibliografia consultada e referida ao longo da tese.

É ainda de referir que no final, são apresentados 3 anexos relativos à composição dos meios utilizados para o isolamento de *Salmonella*, das provas bioquímicas e, dos

meios utilizados nos teste de sensibilidade aos antibióticos. Finalmente, no anexo 4 apresentam-se várias tabelas referentes às diferentes origens onde, estão expostos os resultados de resistência e sensibilidade a cada um dos antibióticos testados.

Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica

1.1. Introdução

1.1.1. O género *Salmonella*

As bactérias do género *Salmonella*, são microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo conhecida há mais de um século (Poppe *et al.*, 2005). Theobald Smith e Daniel Salmon foram os primeiros bacteriologistas a identificar o género quando, em 1885 isolaram *Salmonella* do intestino de porco (Araújo, 1996; Hald, 2001; Calva, 2005).

Morfológica e bioquimicamente, as bactérias deste género apresentam-se na forma de bacilos rectos Gram-negativos, com metabolismo anaeróbio facultativo, são móveis (à excepção de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*), apresentam flagelos peritricos e não formam esporos (Holt *et al.*, 1994; D'Aoust, 2000).

Através da figura 1, é possível observar a morfologia das bactérias do género *Salmonella*. Uma das características morfológicas mais facilmente visível, são os flagelos peritricos os quais, permitem a mobilidade e favorecem o contacto entre a célula bacteriana e a célula alvo contribuindo desta forma para a sobrevivência deste tipo de bactérias e para a invasão das células do hospedeiro. No entanto, esta característica é considerada, por diversos autores, como não essencial para a invasão (Murray, 1986; McDonough *et al.*, 1989).

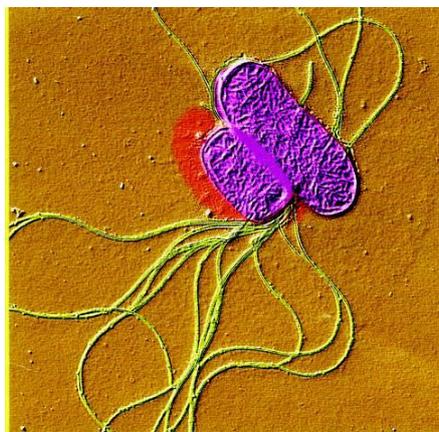


Figura 1 – Bactéria do género *Salmonella* vista por microscopia electrónica.

(Fonte: www.uea.ac.uk/.../images/large/salmonella.jpg)

O género *Salmonella* encontra-se dividido em duas espécies distintas: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, as quais são diferenciadas entre si por características metabólicas. A espécie *Salmonella enterica* está por sua vez, dividida em 6 subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizone*, *houtenae* e *indica*. A diferenciação destas subespécies é feita através das suas características bioquímicas e genéticas (D'Aoust, 2000; Popoff, 2001; Calva, 2005)

A nomenclatura deste género é muito complexa e tem evoluído ao longo dos tempos em que se utilizaram diferentes sistemas de nomenclatura. Os vários esquemas taxonómicos utilizados foram baseados em características bioquímicas, características serológicas, em padrões de electroforese de enzimas e na homologia de DNA (D'Aoust, 2000). Por sua vez na nomenclatura dos serótipos, apenas os nomes dos serótipos da subespécie *enterica* mantiveram os seus nomes. Os nomes dos serótipos não se escrevem em itálico e a sua primeira letra é maiúscula. Apenas os serótipos da subespécie *enterica* têm um nome, os restantes serótipos são designados pela sua fórmula antigénica (Popoff, 2001).

Cada subespécie contém, por sua vez vários serótipos definidos pela sua fórmula antigénica ou seja, tendo como base a estrutura antigénica do microrganismo (Sousa, 2000; Calva, 2005). Assim, é necessário distinguir os três tipos principais de antigénios:

- Somáticos ou O - encontram-se presentes na parede celular constituídos por unidades repetidas de oligossacáridos. Existem mais de 60 antigénios O distintos sendo, distinguidos através de números árabes (Radcliffe and Holbrook, 2000; Calva, 2005);

- Flagelares ou H – são constituídos por proteínas flagelares (flagelinas) (Radcliffe and Holbrook, 2000);

- Capsulares ou K ou Vi – São constituídos por exopolissacáridos superficiais. Este tipo de antigénios é encontrado nos serótipos Typhi, Paratyphi e Dublin (D'Aoust, 1997).

Tal como é possível visualizar na tabela 1, existem mais de 2500 serótipos de *Salmonella* descritos. (Molbak *et al.*, 1999).

Tabela 1 – Número de serótipos das espécies de *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (Adaptado de Popoff, 2001).

Espécie	Subespécie	Nº de serótipos
<i>Salmonella enterica</i>	<i>Enterica</i>	1478
	<i>Salamae</i>	498
	<i>Arizonae</i>	94
	<i>Diarizone</i>	327
	<i>Houtenae</i>	71
	<i>Indica</i>	12
<i>Salmonella bongori</i>		21
Total		2501

Mais de 99% dos serótipos identificados pertencem à espécie *Salmonella enterica* e, dentro desta, a subespécie *enterica* agrupa a maioria dos serótipos. É também esta subespécie que apresenta os serótipos com maior importância clínica. Por sua vez, a ocorrência da outra espécie do género *Salmonella* é extremamente rara (Holt *et al.*, 1994; Popoff, 2001).

Todos os serótipos de *Salmonella* sp. são considerados, desde há muito, como potencialmente patogénicos para o homem, sendo uns mais virulentos do que outros (Hughes, 1991). Segundo Notermans e Hoogenboom-Verdegaal (1992), *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são considerados serótipos muito invasivos.

As bactérias do género *Salmonella* podem surgir em humanos, animais de sangue quente ou frio e ainda, no meio ambiente adoptando desta forma, um perfil ubiqüitário (Notermans and Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Holt *et al.* 1994). A subespécie *enterica* está normalmente associada à ocorrência de doenças nos animais de sangue quente e no homem. Por sua vez, as restantes subespécies e também a espécie *S. bongori* são habitantes do ambiente e associadas a doenças nos animais de sangue frio (Swanenburg, 2000; Hald, 2001; Porwollik *et al.*,2004). As crianças, idosos e indivíduos com deficiência ao nível do sistema imunitário são considerados os mais susceptíveis ao desenvolvimento de sintomas mais severos após a infecção (Araújo, 1996; McKane and Kandel, 1996).

São vários os factores que podem influenciar o desenvolvimento de *Salmonella* sp. dos quais podemos destacar, a temperatura, o pH, a concentração em sais, a actividade da água (a_w) e o nível de nutrientes (D'Aoust, 1991). As bactérias deste género apresentam uma elevada capacidade de adaptação a condições ambientais

extremas de uma forma muito rápida e, num amplo espectro de temperaturas que podem ir de 2°C a 54°C. No entanto, a temperatura considerada óptima para o seu desenvolvimento é de 37°C (Wilcock and Schwartz, 1992; D'Aoust, 1997; Jordano, 2002). Por sua vez, as bactéria do género *Salmonella* têm um pH óptimo entre 6,5 a 7,5. No entanto, segundo Araújo (1996), esta bactéria é capaz de sobreviver em meios com pH entre 4,5 e 9,5. A inativação desta bactéria ocorre a pH menor que 5 e a temperaturas superiores a 60°C (Araújo, 1996; D'Aoust, 1997).

Na tabela 2, estão representadas algumas características que podem ser utilizadas na diferenciação das subespécies de *Salmonella* sp.

Tabela 2 – Característica diferenciais das espécies e subespécies de *Salmonella* sp. (Adaptado de Popoff, 2001).

Espécie Subespécie	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	<i>Enterica</i>	<i>Salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>Diarizone</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+
B-glucuronidase	D	D	-	+	-	d	-
Salicina	-	-	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-	+	-	d	-
y-glutamilttransferase	+	+	-	+	+	+	+

Legenda: + » 90% ou mais dos resultados positivos; - » 90% ou mais dos resultados negativos; d » resultados diferentes consoante os serótipos.

Os isolados de *Salmonella* sp. são facilmente reconhecidos através dos resultados de provas específicas. Assim, os isolados em agar *Triple Sugar Iron* (TSI) produzem ácido e gás a partir da glucose e H₂S. Por sua vez, em meios com lisina devem produzir uma reacção alcalina resultante da descarboxilação da lisina. Por outro lado, estes isolados são incapazes de hidrolisar a ureia. Existem ainda outras provas bioquímicas que se realizam para identificar os isolados de *Salmonella* tal como, a catalase (positiva) e a oxidase (negativa) (D'Aoust, 1997; Holt *et al.*, 1994).

1.1.2. O papel de *Salmonella* sp. nas doenças de origem alimentar

Os microrganismos patogénicos por provocarem doenças de origem alimentar, constituem uma preocupação permanente. Destes microrganismos patogénicos, destaca-se *Salmonella* sp. uma vez que, esta é a responsável pelo grande aumento de surtos distribuídos por todo o mundo (Tokumaru *et al.*, 1990; Arnold *et al.*, 2004; Poppe *et al.*, 2005).

A salmonelose humana é por definição, uma doença maioritariamente de origem alimentar que afecta um grande número de pessoas e, os seus veículos de transmissão são tão amplos que é considerada uma das mais importantes toxinfecções alimentares (D'Aoust, 1999). A salmonelose humana pode classificar-se em dois grandes grupos que originam condições clínicas distintas: a febre entérica e a enterocolite causada por microrganismos não tifóides (Tietjen and Fung, 1995; Araújo, 1996).

A febre entérica (tifóide e paratifóide) pode ser resultado de um contacto com o individuo infectado ou, através de ingestão de alimentos ou água contaminada. Para que esta doença infecciosa grave se estabeleça é necessário apenas uma pequena dose infectante (D'Aoust, 2000; Swanenburg, 2000). Por sua vez, a salmonelose não tifóide provocada por microrganismos não tifóides, é registada como uma das mais importantes causas de toxinfecções alimentares de origem bacteriana (Calva, 2005).

No Homem, os sintomas associados à salmonelose variam de acordo com a estirpe envolvida e a resistência do hospedeiro. Normalmente, os sintomas clínicos são característicos de uma gastroenterite febril que se define pela ocorrência de diarreia, dor de estômago, febre acima de 40°C, dor de cabeça, vômito, náuseas e mal-estar. Nos quadros clínicos mais violentos 2% dos pacientes morrem. Os casos fatais resultam da desidratação, falência renal e/ou choque septicémico (Baird-Parker, 1994; Mead *et al.*, 1999).

Pode-se afirmar no entanto, que raramente se morre de infecção provocada por *Salmonella* sp. (Swanenburg, 2000). Apesar disso, este tipo de toxinfecções leva a custos elevados resultantes do tratamento da doença e da investigação a nível de saúde pública. Leva ainda, a perdas económicas graves dos fabricantes dos alimentos dito contaminados causadores das toxinfecções (Notermans and Hoogenboom-Verdegaal, 1992; D'Aoust, 1994; Sockett and Todd, 2000). Cerca de 4 biliões de dólares é o prejuízo anual na economia norte americana decorrente do problema da salmonelose no homem e em animais (Mead *et al.* 1999).

As bactérias deste género são umas das principais responsáveis por doenças de origem alimentar humana. No mundo elas representam cerca de 10-15% de casos de gastroenterite aguda (Jay, 2000). São vários os alimentos responsáveis pela transmissão de *Salmonella* sp. para o homem nomeadamente, a carne, os ovos, o peixe, as frutas e vegetais, o leite e os seus derivados (Berends *et al.*, 1998; Giovannacci *et al.*, 2001). Destas fontes, a carne de frango, ovos e suínos são consideradas as principais fontes de transmissão de *Salmonella* sp. para o homem (Blaha, 2001; Cortez *et al.*, 2006).

A distribuição ubíqua de *Salmonella* sp. no meio ambiente, a sua prevalência na cadeia alimentar global, a sua adaptação fisiológica a diferentes ambientes, a sua resistência a condições adversas, a sua virulência, a patogenicidade das suas estirpes invasivas, a sua resistência a inúmeros antibióticos, o continuo aumento global dos casos de salmonelose humana e o impacto económico na indústria alimentar, tornam necessária a continua vigilância e investigação desta bactéria (D'Aoust, 1994; Fernández, 2006).

Nos últimos anos tem-se verificado um aumento dos registos em alguns países industrializados, constituindo a sua prevenção um motivo de crescente preocupação na Europa (Heijden, 1995; Jordano, 2002). Portugal não constitui uma excepção, tendo-se constatado que, *Salmonella* sp. foi entre 1992 e 2001, a principal responsável pelos casos de toxinfecções alimentares (Novais, 2003).

Para este aumento de casos de salmonelose, têm surgido diferentes justificações por parte de vários investigadores. Destaca-se o comércio internacional de alimentos em crescimento, o aumento do consumo de alimentos pré-confeccionado, o consumo de alimentos crus ou mal cozinhados e, o armazenamento inadequado dos alimentos quando guardados a temperatura inadequada. Devido aos elevados níveis de higiene que actualmente são impostos pelos países mais desenvolvidos, também levou a uma diminuição da resistência humana às infecções (Araújo, 1996; Hogue *et al.*, 1998; Vieira-Pinto, 2006).

Desta forma, é recomendado que a nível interno os países desenvolvam e melhorem a investigação dos incidentes de *Salmonella* sp. Ao mesmo tempo, a nível internacional, devem ser elaboradas medidas que levem a uma melhoria na investigação e na vigilância (Novais, 2002).

1.1.3. Métodos de detecção de *Salmonella* sp.

Segundo vários investigadores, o controlo de *Salmonella* sp. tem de ser feito recorrendo a métodos eficazes e sensíveis por forma a obter resultados positivos em tempo apropriado para a tomada de medidas rápidas e eficazes (Groody, 1991; Wyatt *et al.*, 1991; Hill and Jinneman, 2000). O método de cultura microbiológica para pesquisa de *Salmonella* baseia-se na capacidade de multiplicação dos microrganismos até ao aparecimento de colónias visíveis (Beckers *et al.*, 1985). Na figura 2 encontram-se ilustradas as várias etapas do método baseado na norma ISO de referência que, apesar de estar bem definido e ser amplamente aplicado, é complexo e bastante moroso (no mínimo 5 dias), devido às inúmeras fases analíticas que antecedem o seu isolamento e a sua identificação (Groody, 1991; Hill and Jinneman, 2000; Dazi *et al.*, 2001). Este método encontra-se dividido em 4 fases (Beckers *et al.*, 1985; Bernardo and Machado, 1990; D'Aoust *et al.*, 1992; Tietjen and Fung, 1995; Taveira, 2000):

- i. Fase de pré-enriquecimento não selectivo - permite a revitalização de células debilitadas até uma condição estável para multiplicação;
- ii. Fase de enriquecimento selectivo - realizada com recurso a um meio com substâncias inibidoras, para promover a multiplicação selectiva de *Salmonella*;
- iii. Sementeira em meios de ágaes selectivos e diferenciais - restringe o desenvolvimento de outras bactérias, permitindo o isolamento de colónias sugestivas de *Salmonella* sp.;
- iv. Caracterização das colónias – através de provas bioquímicas e sorológicas.

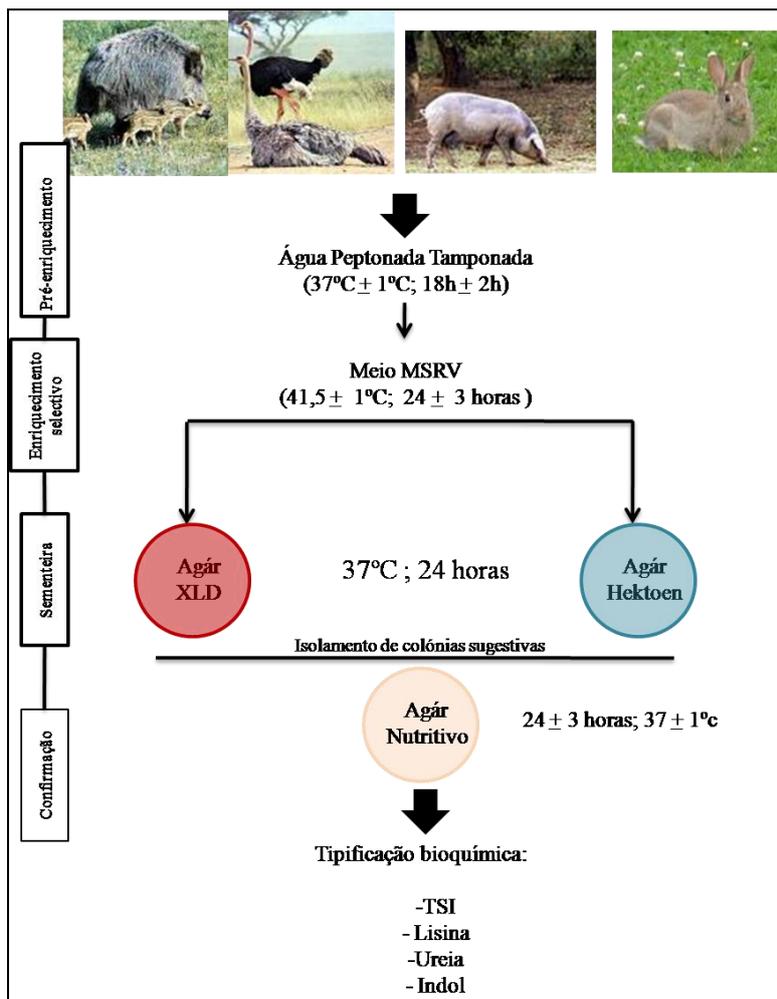


Figura 2 - Diagrama ilustrativo da sequência de passos necessários para o isolamento de *Salmonella* sp. em fezes de animais descrito no anexo D Norma 6579:2002.

Este método apresenta no entanto algumas desvantagens tais como, ser um método pouco sensível uma vez que, a detecção de *Salmonella* por vezes é impedida pela presença de outros microrganismos (Beckers *et al.*, 1987). Além disso, segundo alguns autores não é capaz de dar uma resposta rápida que permita um controlo eficaz do agente, não lhe permitindo, igualmente ser considerado um método ideal para monitorização de rotina de um grande número de amostras (De Medici *et al.*, 1998; Seo *et al.*, 1999).

Muitos outros métodos têm sido estudados e aperfeiçoados para tentar combater as desvantagem do método anterior (Tietjen and Fung, 1995). Aqueles que despertam mais interesse e os que são mais utilizados são os métodos genéticos e os imunológicos (Blackburn, 1993; Feng, 2001). A grande vantagem destes métodos em relação ao método de cultura microbiológica é o facto de serem muito específicos e sensíveis uma

vez que, permitem a detecção de microrganismos mesmo quando estes se encontram a baixas concentrações (Barbour and Tice, 1997; Hill and Jinneman, 2000).

No entanto, para um eficiente controlo de *Salmonella* sp. não basta detectar este agente mas, também definir e identificar as fontes e as vias de disseminação (Millemann *et al.*, 1995; Giovannacci *et al.*, 2001). Par tal, têm sido testados diversos métodos e existe actualmente uma grande diversidade. Dentro destes métodos, pode-se destacar pela sua especificidade, sensibilidade e eficácia, os métodos genéticos (Fang *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2003).

Os métodos imunológicos baseiam-se na detecção antigénica por sua vez, os métodos genéticos baseiam-se na avaliação dos ácidos nucleicos (Blackburn, 1993; Taveira, 2000; Feng, 2001). No entanto, tendo em conta algumas desvantagens dos métodos imunológicos, tais como o facto da expressão dos genes das características a analisar poder ser afectada por factores ambientais (Fitts, 1985; Versalovic *et al.*, 1993) para além da detecção de falsos-positivos devido a reacções cruzadas (D'Aoust, 2000), consideram-se os métodos genéticos mais sensíveis e menos dispendiosos na detecção de *Salmonella* sp. (Versalovic *et al.*, 1993).

Um dos métodos genéticos mais aplicados em microbiologia alimentar são os que se baseiam em reacções de hibridação ou de amplificação por PCR (Hartamn, 1997; Wiedemann, 2004). A grande vantagem deste métodos é a grande sensibilidade que apresentam na detecção de microrganismos patogénicos quando estão presentes em número reduzido (Feng, 2001).

1.2. A técnica de Reacção em Cadeia pela Polimerase (PCR)

A vigilância e o controlo epidemiológico efectivo de *Salmonella* sp. bem como de outros microrganismos patogénicos, necessitam de métodos de tipificação precisos e sensíveis para que o sucesso e credibilidade das investigações sejam garantidos (Gautom, 1997).

Em muitas ocasiões, a amostra de DNA era demasiado pequena ou demasiado antiga para poder ser analisada no entanto, esta limitação deixou de ser um problema quando em 1985, Kary Mullis desenvolveu uma técnica que hoje designamos por reacção em cadeia pela polimerase (PCR). Esta técnica é hoje um instrumento de uso

rotineiro nos laboratórios de genética molecular que a utilizam para amplificar rapidamente regiões de DNA (Tamarin, 1999).

Esta técnica de PCR veio revolucionar a ciência e passou a ser aplicada nas mais diversas áreas. Por exemplo, esta técnica pode ser usada no diagnóstico médico, na detecção de doenças hereditárias e infecciosas, no mapeamento genético, nos testes de paternidade e testes forenses, na avaliação da presença ou ausência de mutações e estudos moleculares de evolução (Matos, 2001; Videira, 2001).

No nosso trabalho, após a detecção de resistência a antibióticos para cada uma das estirpes, utilizamos esta técnica para a detecção de genes responsáveis por essas mesmas resistências.

Esta técnica tem como base a propriedade do DNA de poder ser desnaturado quando se encontra em solução líquida, a temperatura elevada, e replicado em presença de uma polimerase termoestável e de primers adequados. Tal permite a amplificação *in vitro* de um fragmento compreendido entre dois primers (Saiki *et al.*, 1985). Um fragmento de DNA pode ser amplificado mais de 10^6 vezes, em cada uma das reacções de PCR (Olsen, 1999).

Num ciclo de PCR, para que a síntese de novas cadeias de DNA ocorra, é necessário a intervenção de vários componentes tais como, a *Taq*-polimerase, *primers* para iniciar a síntese de DNA, desoxirribonucleosídeos trifosfato “dNTPs”, tampão para manter o pH, água ultra pura e o DNA molde (Videira; 2001).

Cada amplificação é constituída por três etapas repetidas ciclicamente, tal como se pode observar pela figura 3. Cada uma é efectuada a temperatura apropriada e controlada e, durante um período de tempo determinado (Taveira, 2000):

1. Desnaturação térmica das cadeias duplas de DNA (92°-95°C);
2. Hibridação (ligação) dos *primers* às sequencias iniciadoras, que lhe são complementares. Ocorre a determinada temperatura conforme as condições de restringência;
3. Extensão das pequenas regiões de cadeia dupla originadas. Inicia-se pela extremidade 3'-OH livre dos primers e a *Taq polimerase* adiciona nucleótidos complementares da cadeia. Esta etapa realiza-se a temperaturas entre 68°-72°C.

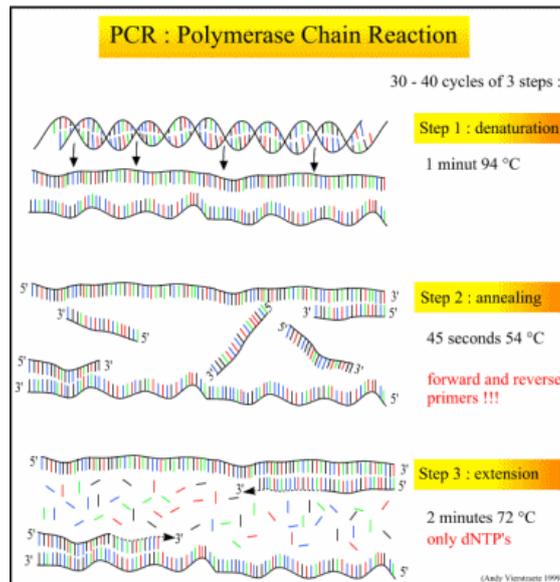


Figura 3 – Esquema representativo da reacção de PCR.
(Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/Biotecnologia/PCR.php>)

Os primers são desenhados e sintetizados de modo a ligarem-se às extremidades opostas (3') de cada uma das cadeias de DNA molde que se pretende amplificar. O emparelhamento dos primers é realizado através de pontes de hidrogénio, segundo o emparelhamento convencional Adenina-Timina e Citosina-Guanina (Videira, 2001).

Este método apresenta inúmeras vantagens tais como, a quantidade de DNA a utilizar ser reduzida, o material genético a utilizar poder estar em estado de conservação não perfeito, a quantidade de material gerado ser elevada, serem necessários poucos equipamentos e reagentes, a simplicidade, sensibilidade e especificidade do método. Além disso, é um método muito rápido e os custos são relativamente mais baixos (Versalovic *et al.*, 1993; Hald, 2001; Eriksson *et al.*, 2005).

No entanto, esta técnica também tem algumas limitações das quais se podem destacar, a necessidade de se conhecer a sequência de DNA a amplificar para que possam ser sintetizados os primers específicos e o facto de esta técnica ser muito sensível e por isso, facilmente poder sofrer contaminação da amostra por DNA estranho (Van Belkum *et al.*, 2001).

1.3. Os antibióticos

1.3.1. Descrição e Classificação

Os antibióticos são de uma forma geral, definidos como substâncias naturais produzidas por microrganismos como bactérias e fungos (Poeta, 2006). Na sua maioria, os antibióticos são apenas parcialmente metabolizados pelos organismos, e poucos são biodegradáveis em meio aquático (Kummerer, 2004). Segundo o tipo de acção, os antibióticos podem ser classificados de bacteriostáticos se inibem o crescimento ou a proliferação de bactérias, ou de bactericidas se provocam a sua morte (Poeta, 2006).

Dada a natureza procariótica da célula bacteriana, os antibióticos usados na terapêutica devem distinguir as diferenças biológicas entre esta célula e a célula humana. O grupo dos antibióticos é muito heterogéneo, desde os activos na parede celular até aos antibióticos inibidores de síntese proteica (Sousa *et al.*, 1999). Assim, segundo o seu tipo de acção, os antibióticos podem classificar-se como:

Antibióticos inibidores da síntese do peptidoglicano

Os β -lactâmicos são um grupo de antibióticos constituídos por, penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenemos e os inibidores das β -lactamases. Estes antibióticos actuam na síntese da parede celular mediante a inibição de enzimas importantes para a formação do peptidoglicano (Livermore, 1995).

Todos os elementos deste grupo apresentam um anel β -lactâmico constituído por 3 átomos de carbono e um de nitrogénio, com radicais substituintes. Este anel, nas penicilinas encontra-se fundido com um anel tiazolidina mas, nas cefalosporinas encontra-se fundido com um anel di-hidrotiazina (Sousa *et al.*, 1999).

Este grupo constitui o grupo mais amplo utilizado na clínica veterinária e humana (Livermore, 1995) pois, apresentam uma toxicidade selectiva uma vez que, as células humanas não contém parede celular (Sefton, 2002).

Antibióticos inibidores da síntese proteica

Estes antibióticos actuam nos ribossomas 70S bacterianos e, de uma forma geral, não afectam a síntese proteica nas células eucarióticas (Sousa *et al.*, 1999). No grupo dos aminoglicósidos estão incluídos vários antibióticos de amplo espectro e bacteriocinas tais como, apramicina, estreptomicina, canamicina, neomicina,

gentamicina, netilmicina (Sefton, 2002). Estes são constituídos por um anel aminociclitol, derivado do inositol, unido a açúcares aminados através de ligações glicosídicas (Sousa *et al.*, 1999).

Os antibióticos que pertencem ao grupo das tetraciclinas são: a oxitetraciclina, tetraciclina, clorotetraciclina e doxiciclina (Walsh, 2003). Todos têm em comum um núcleo hidroxinaftaceno, formado por 4 anéis benzénicos fundidos, o que originou a sua designação. A clorotetraciclina foi o terceiro antibiótico a ser utilizado terapêuticamente (Sousa *et al.*, 1999). Por sua vez, a tetraciclina apresenta um efeito bacteriostático uma vez que é capaz de inibir a síntese de proteínas evitando a união do local aminoacil ARNt à subunidade ribossomal 30S (Walsh, 2003).

Finalmente, o cloranfenicol inibe a síntese proteica a nível da subunidade 50S dos ribossomas bloqueando desta forma, a peptidil transferase e impedindo a formação de pontes peptídicas entre os aminoácidos da cadeia em crescimento (Sefton, 2002).

Antibióticos inibidores da síntese dos ácidos nucleicos

As quinolonas são agentes antibacterianos de síntese, derivados do ácido nalidíxico. Quimicamente são 4-oxo-1,4-dihidroquinolinas, mas normalmente são designados de 4-quinolonas (Sousa *et al.*, 1999).

Este grupo inclui vários antibióticos entre os quais se podem destacar, ciprofloxacina, ácido nalidíxico, danofloxacina, flumequina e marbofloxacina. Estes antibióticos exercem a sua acção depois de penetrarem no citoplasma bacteriano e, no interior da célula, actuam sobre a replicação de DNA através de mecanismos complexos inibindo, a DNA girase e a topoisomerase IV (Walsh, 2003).

Actualmente, a maioria destes agentes utilizados em clínicas são fluorados uma vez que, são consideravelmente mais activos e possuem um espectro de acção maior (Sousa *et al.*, 1999).

Antibióticos inibidores da síntese de ácido fólico

As sulfonamidas como o sulfametoxazol e o trimetoprim, são agentes antibacterianos sintéticos de amplo espectro e com actividade frente a uma grande variedade de microrganismos. Estes antibióticos actuam bloqueando a síntese de ácido fólico (Masters *et al.*, 2003).

As sulfonamidas são análogos estruturais do ácido p-aminobenzoico. Por sua vez, o trimetoprim é um análogo estrutural da porção pteridina do ácido dihidrofólico e pode actuar sinergicamente com o sulfametoxazol (Sousa *et al.*, 1999).

1.3.2. Impacto do uso de antibióticos

Alexandre Fleming marcou a história da medicina quando, em 1928 descobriu a penicilina. Mais tarde foi descoberta a estreptomicina, iniciando, desta forma, a era dos antibióticos inibidores da síntese proteica. Uma vez que, a utilização dos antibióticos simbolizava o triunfo dos antibióticos contra as bactérias patogénicas responsáveis por graves doenças, a aplicação de antibióticos foi considerado o maior e mais importante sucesso do século XX (Ferber, 2003).

No entanto, nos últimos anos a comunidade científica tem mostrado um grande interesse no problema da resistência aos antibióticos, devido às graves consequências no tratamento de doenças infecciosas. Muitos trabalhos científicos têm mostrado a relação íntima entre os antibióticos utilizados em animais e humanos e, o aparecimento de altas resistências em bactérias de elevada importância em patologia humana e animal (Pidloch, 1996; Witte, 1998; Torres and Zarazaga, 2002).

Um antibiótico ao ser administrado apenas provoca a selecção dos mutantes resistentes da população. O antibiótico inibe ou mata as bactérias, mas não afecta os poucos indivíduos que, por mutação espontânea adquiriram resistência. Estes indivíduos multiplicam-se, de modo a que no final, são os que prevalecem (Goodman and Guilman, 1996).

Pelo facto de poderem ocorrer amplas variações na sensibilidade de diferentes estirpes da mesma espécie bacteriana aos agentes antimicrobianos, antes de se escolher um antibiótico, é necessário obter informação sobre o padrão de sensibilidade do microrganismo infectante. Assim, pode-se afirmar que o êxito da terapia baseada nos antibiogramas depende, do conhecimento da sensibilidade do agente etiológico *in vitro*. O método da dupla difusão em disco é o mais utilizado para detectar a sensibilidade das bactérias aos antibióticos. Uma das aplicações dos antibiogramas tem como finalidade orientar o médico na escolha do antibiótico mais indicado para combater a bactéria isolada no processo infeccioso (Goodman and Guilman; 1996).

1.3.3. As alternativas actuais

O uso exagerado de antibióticos leva a uma diminuição da eficiência destes ao mesmo tempo que, aumenta a morbidade e a mortalidade, criando-se uma maior dificuldade em encontrar um tratamento adequado. Assim, os tratamentos são cada vez mais prolongados tornando-se necessária a substituição dos fármacos por outros antibióticos mais caros e mais tóxicos (Luna *et al.*, 2001; Camargo, 2003).

Uma das alternativas recomendadas é o uso de probióticos que são microrganismos que se incluem na dieta estimulando o sistema imunitário e actuando no metabolismo intestinal, tornando-o mais eficiente (Anadon *et al.*, 2006). Outras alternativas são as enzimas adicionadas às dietas de suínos e frangos que melhoram o nível de digestão e, conseqüentemente, o aproveitamento dos nutrientes (Errecalde, 2004). Também os ácidos orgânicos, extractos vegetais, óleos essenciais e os probióticos, são algumas das opções aos antibióticos usados como promotores (Anjos, 2006). As bacteriocinas podem também oferecer uma solução alternativa uma vez que, permitem diminuir a intensidade de selecção de resistência a antibióticos (Riley and Wertz, 2002).

O Homem pode aproveitar esta grande diversidade de moléculas para as utilizar como inibidores de microrganismos patogénicos nos alimentos e como antibióticos alternativos em medicina humana e veterinária de forma a evitar o aparecimento de estirpes multirresistentes (Rojas, 2004).

Desta forma, é importante e imprescindível continuar com os estudos relacionados com a vigilância da resistência aos antibióticos e dos factores de virulência.

1.4. A resistência bacteriana aos antibióticos e a sua importância na saúde humana e animal

A primeira descrição de resistência bacteriana a antibióticos foi feita em 1940, por Abraham e Chain, quando isolaram estirpes *S. aureus* produtoras de penicilinas ou seja, de enzimas inativadoras de penicilinas. Em 1950 surgiu, no Japão estirpes de *Shigella* resistentes às sulfonamidas e, dois anos mais tarde, estirpes co-resistentes às sulfonamidas, estreptomicina e tetraciclina (Neva and Brown, 1994).

Nos últimos anos, a resistência a antimicrobianos tem aumentado significativamente. As bactérias *Campylobacter* e *Salmonella* são dois exemplos de microrganismos que se têm apresentado cada vez mais resistentes a antibióticos, particularmente a quinolonas e cefalosporinas de terceira geração (Angulo *et al.*, 2004).

A resistência antimicrobiana tem constituído um assunto amplamente estudado em todos géneros bacterianos, sendo que, no caso dos responsáveis por zoonoses merece especial atenção, pois pode ser transmitida via alimentos para os seres humanos (Aaerstrup, 1999). Tem-se vindo a assistir ao aumento global do uso de antibióticos na medicina, veterinária e agricultura, bem como a persistência destes compostos no meio ambiente constitui um sério problema (Kummerer , 2003; Schluter *et al.*, 2007; Kim and Aga, 2007).

O fraco controlo do uso de antibióticos como promotores do crescimento de animais de consumo, levantou durante muitos anos, controvérsia sobre o seu uso. No entanto, em 1970, na então Comunidade Económica Europeia (CEE), publicou-se a directiva 70/524 que estabeleceu que, apenas os antibióticos que tivessem efeito demonstrado sobre o crescimento animal poderiam ser utilizados. Desta forma, na Europa, as tetraciclinas e β -lactâmicos foram proibidas (Phillips *et al.*, 2004). Uma vez que naquela altura ainda não havia provas concretas sobre a relação causa-efeito do uso dos antibióticos, estas proibições geraram grande problemática. Esta lista de proibições sofreu, ao longo dos tempos, modificações (Turnidge, 2004).

A selecção e disseminação de clones e genes é também muito elevada a nível hospitalar onde o uso de antimicrobianos é inevitável. A ligação entre os antibióticos utilizados em hospitais e o aumento das resistências, pode ser demonstram através de vários factores, tais como (McGowan, 1987):

- A resistência ser mais prevalente em estirpes hospitalares;

- Mudanças na prescrição de antibióticos induzem alterações nos padrões de resistência;
- As Unidades de Cuidados Intensivos, uma vez que são zonas hospitalares com maior uso de antibióticos, apresentam maior prevalência de estirpes resistentes;
- O uso prolongado da terapia anti-bacteriana induzem aumentos na resistência;
- O risco de infecções mais graves pode aumentar devido ao aumento de doses de antibiótico elevadas.

O desenvolvimento de resistência bacteriana, para além de determinar uma menor eficácia do antibiótico, também pode representar um potencial de risco para a saúde pública, uma vez que, o contacto dos animais com o Homem pode aumentar a ocorrência de resistência a bactérias (Bongers *et al.*, 1995).

O uso crescente de antimicrobianos tem sido acompanhado da emergência de linhagens resistentes em diversos microrganismos, inclusive patogénicos (Fedorka-Cray *et al.*, 1998). A resistência bacteriana pode ser transferida por diversos mecanismos, podendo estabelecer-se entre microrganismos de uma mesma população ou de diferentes populações, como da microflora animal para humana e vice-versa (Nijsten *et al.*, 1993).

Durante décadas a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol foram os agentes antimicrobianos recomendados para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella*. Taxas elevadas de resistência a esses agentes têm reduzido significativamente a eficácia desses antibióticos para o tratamento dessas infecções (Bradford *et al.*, 1998). A resistência a antimicrobianos surgiu de forma crescente. Além da pressão selectiva exercida pelo uso excessivo de antibióticos, há evidências na literatura que sugerem o aparecimento de espécies multirresistentes devido a utilização de antibióticos em pecuária (Hakanen *et al.*, 1999).

A resistência antimicrobiana é comum entre os serótipos de *Salmonella*. Muitas das estirpes apresentam grande potencial zoonótico provocando doença tanto em animais domésticos como nos humanos, sendo os alimentos de origem animal o principal veículo de transmissão destes organismos resistentes (Varma *et al.*, 2005). *S. Typhimurium* e *S. Newport* são os serótipos de *Salmonella* que têm apresentado mais estirpes multirresistentes (Angulo *et al.*, 2004; Yan *et al.* 2003).

Estudos realizados revelaram que a necessidade de hospitalizações para seres humanos é 2,5 vezes maior em surtos ocasionados por estirpes de *Salmonella* resistentes

a antibióticos quando, comparada com os ocasionados por estirpes sensíveis. Tal facto, demonstra a importância dos estudos sobre a resistência a antibióticos em *Salmonella* sp. e sua importância na saúde humana e animal (Farrinton *et al.*, 2001; CDC, 2002).

As bactérias apresentam uma elevada diversidade de mecanismos de resistência aos antibióticos. Podem-se destacar quatro tipos de mecanismos de resistência principais:

1. Modificação dos locais alvo

As bactérias podem adquirir mutações que modificam certas características do alvo, diminuindo a afinidade com o medicamento (Poeta *et al.*, 2007). A modificação do alvo devido às enzimas alteradas dihidropteroato sintetase e dihidrofolato redutase, conferem resistência às sulfonamidas e trimetoprim respectivamente (Sefton, 2002).

Por sua vez, a resistência às quinolonas e à novobiocina podem surgir através de mutações nos genes *gyrA*, *gyrC* e *gyrD* (Reynolds, 1984; Sefton, 2002).

2. Acumulação reduzida do antibiótico

Este tipo de resistência pode ser intrínseco ou adquirido (Nikaido and Vaara, 1985; Nikaido, 1988). A este mecanismo tem sido associada a resistência a vários antibióticos, nomeadamente, aminoglicosídeos, quinolonas, cloranfenicol, tetraciclina e β -lactâmicos (deGroot, 1991).

Os genes plasmídicos podem codificar proteínas membranares (*tet A*, *B* e *C*), as quais funcionam como bombas de efluxo de extrusão da tetraciclina, à custa de ATP. A tetraciclina, geralmente, inibe a síntese proteica bacteriana, interagindo com a subunidade ribossomal 30s (Bryen, 1989; Hancock and Woodruff, 1988).

3. Inativação do antibiótico

Este mecanismo de resistência consiste na inativação do antibiótico por intermédio de enzimas. Existem três grupos principais de enzimas:

- Enzimas de modificação de aminoglicosídeos – estas enzimas podem ser de três tipos: acetiltransferases, adeniltransferases e fosfotransferases (Bryen, 1988);

- Cloranfenicol acetil transferases (CAT) – esta enzima encontra-se em plasmídeos ou transposões, e cataliza a desacetilação do cloranfenicol com a Coenzima A (CoA) . O composto resultante é inativo na inibição da síntese proteica (Bajanca-Lavado, 1996);

- β -lactamases - Os antibióticos β -lactâmicos representam uma das classes terapêuticas mais utilizadas no tratamento de infecções bacterianas, tanto no meio hospitalar como na clínica veterinária, devido à sua baixa toxicidade e ampla margem terapêutica (Marín and Gudiol, 2003; Li *et al.*, 2007). Estes antibióticos bloqueiam a síntese da parede celular bacteriana, através da inibição das enzimas transpeptidases, carboxipeptidases e transglicosidases, essenciais para a formação do peptidoglicano. Estas enzimas denominam-se de proteínas fixadoras da penicilina (*Penicilin Binding Proteins* - PBP) (Tipper,1985).

4. Desvio metabólico

A resistência exibida quando a existência de um desvio metabólico caracteriza-se pela síntese de um local alvo alternativo, para o antibiótico. Este é o principal mecanismo de resistência às sulfonamidas e ao trimetoprim. A resistência ao trimetoprim é uma consequência resultante da síntese de uma dihidropteroato sintetase alterada, normalmente localizada em plasmídeos (deGrott, 1991).

1.5. Elementos genéticos responsáveis pela dispersão de genes de resistência

Os antibióticos não são os causadores de resistência mas, permitem que as resistências que surgem naturalmente numa população sobrevivam em relação a outras que não apresentam esse mesmo factor de resistência. A localização dos genes que codificam a resistência específica a um dado antibiótico, em elementos genéticos móveis permite a transmissão dessa resistência entre bactérias (Poppe *et al.*, 2005).

Existem quatro processos diferentes de transferência de genes de um microrganismo para outro:

1. A transformação é o processo muito eficiente de transferência genética em que o DNA que se encontra no ambiente é incorporado no genoma do receptor através de recombinação (Madigan *et al.*, 1996; Lewin, 1996).

2. A conjugação é um processo de transferência unidireccional através do qual o DNA é transferido por contacto celular. Os genes que codificam a resistência a antibióticos encontram-se, frequentemente, em plasmídeos conjugativos (Davies and Smith, 1978).

3. A transdução é o processo de transferência genética mediada por bacteriófagos. Através deste processo ocorre incorporação de DNA bacteriano no interior do bacteriófago, posteriormente pode ser transferido, através de infecção pelo fago, para outra bactéria (Madigan *et al.*, 1996; Lewin, 1996).

4. Finalmente, a transposição é o processo de transferência mediado por transposões. Este mecanismo envolve plasmídeos conjugativos, não conjugativos e cromossomas (Lupski, 1987).

A multirresistência e certos factores de virulência em bactérias tem sido relacionada com a presença de plasmídeos e integrões, elementos que podem ser os responsáveis pela sua disseminação. A maioria dos isolados multirresistentes a antibióticos apresenta um gene localizado em cassete o qual codifica a resistência a vários antimicrobianos como ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina (Poppe *et al.*, 2005).

A localização de genes de resistência específicos nesses elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposões ou genes cassete em integrões), permite a transferência da resistência entre bactérias que podem, inclusive, pertencer a géneros ou espécies

diferentes (Jacoby and Archer, 1991; Caratolli, 2001; Poppe *et al.*, 2005). Tal é possível uma vez que, o conjunto destes elementos facilita a transferência horizontal de genes de resistência entre linhagens distintas e entre espécies de grupos filogenéticos bastante afastados (Coelho, 2001).

É possível encontrar-se num mesmo elemento genético, vários genes implicados na resistência a distintas famílias de antibióticos, levando desta forma, ao surgimento de bactérias com fenótipo de multirresistência (Fluit and Schmitz, 2004).

1.5.1. Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA de cadeia dupla, circulares e unidos covalentemente. Estes, são definidos como sendo elementos genéticos extracromossómicos com capacidade de replicação autónoma (Fernández, 2006).

A transferência do plasmídeo entre estirpes e espécies bacterianas próximas é estabelecida por transferência genética entre duas bactérias (uma dadora e outra receptora) através do processo de recombinação genética. Desta forma, o DNA da bactéria dadora é incorporado no DNA da bactéria receptora (Hughes and Datta, 1983).

Estes elementos genéticos, normalmente, contém genes que não são essenciais à sobrevivência da bactéria, tais como genes que afectam a replicação, o metabolismo, a fertilidade bacteriana, a produção de toxinas, entre outros (Lewin, 1996). Estes elementos podem transportar um ou mais genes que lhe conferem a resistência a certos antibióticos. Na figura 4, o gene selectivo *amp^r* codifica a enzima β -lactamase, que inactiva a ampicilina enquanto que o gene *tet^r* codifica a resistência a tetraciclina. No entanto, a bactéria não necessita de plasmídeos para a sua sobrevivência (Madigan *et al.*, 2000).

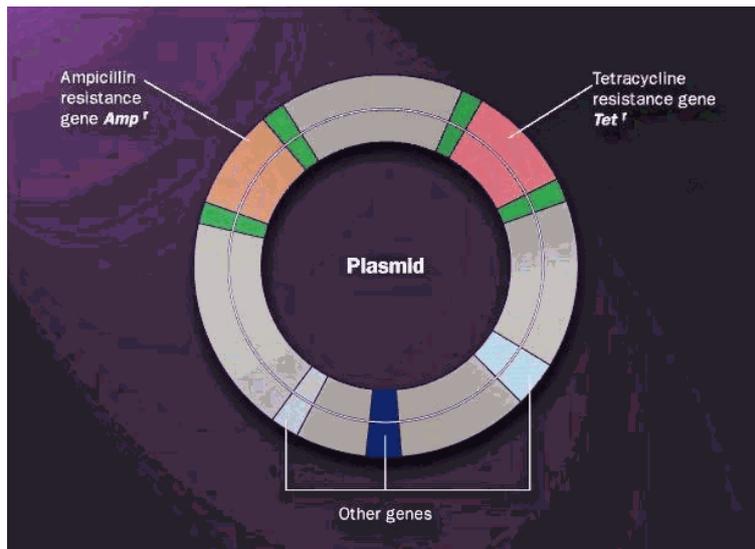


Figura 4 – Diagrama representativo de um plasmídeo.

(Fonte: www.dbio.uevora.pt/LBM/Foco/Hospedeiros/Image35.gif)

1.5.2. Transposições

Os elementos genéticos transponíveis podem ser também designados como elementos genéticos móveis. Estes elementos genéticos são caracterizados como sendo pequenos fragmentos de DNA móveis que, constituem partes de cromossomas ou de plasmídeos para além de apresentarem capacidade de movimento de um lugar para outro dentro do genoma (Haren *et al.*, 1999).

Na maioria dos casos, esse movimento é aleatório e acontece com uma frequência muito reduzida. Os elementos genéticos móveis incluem transposições, que se movem apenas numa única célula, e os bacteriófagos que se movem entre bactérias. Assim podem-se considerar três classes de transposições (Lewin, 2001):

- Transposições exclusivos de DNA;
- Retrotransposições semelhantes a retrovírus;
- Retrotransposições de origem não-retroviral.

No entanto, ao contrário dos plasmídeos definidos no ponto anterior, estes elementos não apresentam capacidade de replicação autónoma (Haren *et al.*, 1999). Estes elementos facilitam a transmissão da resistência a antibióticos, que também pode estar codificada nos genes do cromossoma bacteriano, para novas linhagens bacterianas (Coelho, 2001). Desta forma, têm um profundo impacto na estrutura e função dos genes, bem como na organização dos cromossomas na espécie (Daboussi, 1997).

Segundo vários autores, os elementos genéticos móveis são responsáveis por um elevado número de mutações espontâneas, o que leva a modificações na expressão dos genes, alteração das sequências de bases e a modificações estruturais nos cromossomas (Langin *et al.*, 1995; Deschamps *et al.*, 1999; Hua-Van *et al.*, 2000).

1.5.3. Integrões

Os integrões são elementos genéticos que foram descobertos no início da década de 80, através de um estudo molecular a determinados genes de resistência onde se verificou a existência de uma sequência comum na região 5' que apresentava um promotor e, um gene codificante de uma integrase semelhante às descritas nos bacteriófagos (Sabaté and Prats, 2002).

Estes elementos assemelham-se aos transposões, mas não possuem sequências terminais repetidas, nem codificam as proteínas necessárias para a sua transposição. Estes podem ser caracterizados pela presença de sequências específicas para o alvo de integração. Apresentam a capacidade de adquirir diversos genes para a resistência aos antibióticos e de os expressar através de promotores intrínsecos (Stokes and Hall, 1989).

De uma forma geral e, tal como é possível observar pela figura 5, os integrões são constituídos por 3 elementos essenciais à captura e expressão de genes exógenos: um gene que codifica uma integrase (*intI*); o lugar de recombinação sítio-específico (*attI*) e, um promotor (*Pant*) necessário para a expressão dos genes cassette integrados. Por vezes, pode ainda surgir um segundo promotor mais forte (P2), localizado 39pb do primeiro promotor (Fluit and Schimtz, 1999).



Figura 5 – Representação esquemática da estrutura geral dos integrões
(adaptado de Fernández, 2006)

Os integrões não são móveis mas encontram-se, frequentemente, associados a transposões localizados em plasmídeos conjugativos (Olsen, 1999; Mazel, 2006).

A presença de integrões é frequentemente descrita em estirpes clínicas de humanos no entanto, existem alguns estudos que descrevem a presença de integrões em estirpes isoladas de animais de companhia, animais para consumo, água, solo e alimentos (Roe *et al.*, 2003; Sáenz *et al.*, 2004).

Os integrões caracterizam-se pela capacidade de reconhecimento de uma ampla variedade de sequências de recombinação, e pela capacidade ilimitada de intercâmbio e reserva de genes cassete. Além disso, estas estruturas funcionam como sistemas de captação de genes, o que confere vantagens selectivas e, raramente captam genes considerados indispensáveis para a bactéria (Nield *et al.*, 2001).

A classificação das várias classes de integrões é feita de acordo com a sequência da integrase. Assim, actualmente são conhecidas nove classes distintas de integrões. Os que contêm os genes de resistência antimicrobiana são as classes 1, 2 e 3 (Arakawa *et al.*, 1995; Recchia and Hall., 1995). Por outro lado, os das classes 4, 5, 6 e 7 contêm genes cassete que não codificam a resistência a antibióticos (Clark *et al.*, 2000; Nield *et al.*, 2001). Os integrões que não apresentam nenhum gene cassete são os da classe 8 e finalmente, os da classe 9 são os que apresentam um gene cassete, *dfrA1*, que confere resistência ao trimetoprim (Hochhut *et al.*, 2001).

Para além dos integrões possuem um elevado número de possibilidades de recombinações e de intercâmbio, os genes de resistência proporcionam às bactérias que os possuem uma grade versatilidade frente aos antibióticos (Fernández, 2006).

Os integrões que se encontram com maior frequência são os pertencentes à classe 1. Este tipo de integrões caracteriza-se por apresentar a sequência 59 conservada (59-CS), que contém um gene responsável por codificar a integrase. Para além desta sequência, a maioria dos integrões deste tipo possui ainda outra sequência, a sequência 39 conservada (39 –CS), que por sua vez apresenta um gene que confere resistência a componentes de amónio quaternário (*qacEΔ1*) e um gene de resistência às sulfamidas (*sul1*) (Fluit *et al.*, 1999; Koseoglu, 2004).

Este tipo de integrões foi descrita em diversos géneros de bactérias Gram-negativas, dos quais se podem citar, *Campylobacter*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Shigella* e *Vibrio* (Fluit *et al.*, 2004).

Por sua vez, os integrões da classe 2 encontram-se no transposição 7 e, apresentam um segmento conservado 5' idêntico aos presentes nos integrões da classe referida atrás (Ploy *et al.*, 2000).

Capítulo 2 – Objectivos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS-2007) "a salmonelose constitui um dos mais comuns problemas de saúde pública. Milhares de casos humanos são reportados anualmente no mundo, originando milhares de mortos e verificando-se, nos últimos anos, um aumento na incidência e severidade da infecção".

Este aumento significativo de salmoneloses nos últimos trinta anos, tem sido verificado até mesmo em países com excelentes serviços de saúde. Tal facto, torna-se ainda mais preocupante pela sua associação a uma grande biodiversidade de serótipos.

Outro rápido e preocupante aumento é o da resistência aos antibióticos e a emergência de estirpes multirresistentes de *Salmonella* sp. isoladas em animais e humanos.

Assim, este trabalho teve como principais objectivos:

- O isolamento de *Salmonella* sp. a partir de amostras fecais de diferentes origens (javali, porco bísaro, coelho bravo e avestruz);
- Identificar o serótipo correspondente para cada um dos isolados e verificar a importância desta avaliação ao nível da saúde pública e animal;
- Estudar a resistência a antibióticos em estirpes de *Salmonella* sp. isoladas a partir de diferentes origens (javali, porco bísaro, coelho bravo e avestruz);
- Realçar a importância da vigilância da resistência aos antibióticos em estirpes de origem animal, principalmente no caso do controlo de espécies bacteriana potencialmente patogénicas para o Homem, como é o caso da *Salmonella*.
- Caracterizar geneticamente os mecanismos de resistência aos antibióticos, de acordo com o fenótipo de resistência obtido para cada estirpe;
- Detectar e estudar os integrões de classe 1 e 2 e respectivas regiões variáveis;
- Comparar estirpes de origens, serótipos e fenótipos de resistência diferentes ao nível dos perfis proteicos.

Capítulo 3 - Material e Métodos

3.1. Amostras fecais

As amostras fecais de javali foram recolhidas entre 2006 e 2007, no Norte de Portugal. Graças à colaboração de vários intervenientes, as amostras foram retiradas do intestino de javalis capturados em montarias. De igual forma, foram recolhidas amostras fecais de coelho bravo caçados no mesmo período de tempo. Por sua vez, as fezes de porco bísaro foram recolhidas igualmente do intestino de cada animal nas instalações para animais no campus da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro em Outubro de 2007. Finalmente, as fezes de avestruz, retiradas da mesma forma que nas origens anteriores, foram-nos cedidas gentilmente pelo proprietário de uma exploração situada no Alentejo em 2007.

De cada animal foram recolhidas, com auxílio de uma espátula, para um frasco apropriado, aproximadamente 7g de fezes que, foram mantidas a 4°C até chegarem ao nosso laboratório.

Neste estudo, foram utilizadas no total 243 amostras fecais (77 javalis, 77 coelhos bravos, 35 porcos bísaro, 54 avestruzes). Cada frasco utilizado correspondeu a uma amostra e portanto, a um animal distinto.

3.2. Meios de cultura e provas de identificação utilizadas para o isolamento

Ao longo deste trabalho, foram utilizados vários meios de cultura e soluções necessárias para a correcta realização das metodologias. A composição e as quantidades necessárias a utilizar estão descritas nos anexos 1, 2 e 3 deste trabalho.

3.3. Isolamento de estirpes de *Salmonella* sp.

De cada animal recolheu-se, para um frasco apropriado, aproximadamente 7g de fezes que, foram mantidas a 4°C até chegarem ao nosso laboratório. Cerca de 2 a 3g de cada amostra foi, posteriormente, diluída em caldo BHI, na proporção de 1:10, para depois poder ser semeada em placas de agár. O restante de cada amostra guardou-se a temperaturas de congelação. Utilizou-se o método descrito no Anexo D da norma ISO

6579:2002 para o isolamento de *Salmonella* sp. em amostras fecais da produção primária.

Colocou-se aproximadamente 5 ml de amostra num frasco contendo 45 ml de água peptonada durante 18 horas a 37°C. Fez-se a sementeira numa placa de meio semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV) durante 24 horas a 41°C e utilizou-se um controlo positivo e um negativo. De todas as placas de MSRV positivas, eram efectuadas repicagens para 2 agáres selectivos: Xilose Lysine Desoxycholate (XLD) com novobiocina e Hektoen com novobiocina, estas eram incubadas a 37°C durante 24 horas. De seguida, as colónias sugestivas de salmonella eram repicadas e isoladas em agár XLD.

3.4. Identificação fenotípica das bactérias

Após o isolamento descrito no passo anterior, permitiu-se o crescimento e multiplicação das bactérias no meio agar nutritivo para, desta forma se proceder às provas bioquímicas. Assim, cada colónia isolada foi submetida à prova do TSI (Triple Sugar Iron), da lisina, da ureia e do indol. Nestas provas era sempre utilizado um controlo positivo (*Salmonella*) e um negativo.

Identificaram-se como *Salmonella* sp. os isolados que em agar *Triple Sugar Iron* (TSI) produzem ácido e gás a partir da glucose e H₂S. Por sua vez, nos meios com lisina ocorreu a descarboxilação da lisina. Nas restantes duas provas, considera-se *Salmonella* sp. no caso de darem negativos. No entanto, é importante referir que nenhuma destas provas é, por si só conclusiva. Apenas se considera positivo quando a conclusão resultante das 4 provas em conjunto nos dão evidências de isso.

Ureia (Pg.260 do manual da Merk):

- Inocular massivamente o meio com colónias puras;
- Incubação a 35°C > 48 horas;
- O meio é vermelho-alaranjado;
- **Ureia positiva** (Meio vermelho):
 - *Proteus* (*P. vulgaris*; *P. mirabilis*), *Morganella*, etc.
- **Ureia negativa ou fracamente +** (Meio amarelo):
 - *Shigella*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, etc.

✚ Lisina descarboxilase caldo (ISO – 6579: 2002) (Pg. 2-134 da OXOID):

- Inocular o meio imediatamente abaixo da sua superfície;
- Incubar a 35° C por 24 horas e examinar em intervalos regulares;
- O meio por incubar deve ser azul esverdeado;
- **Reacção positiva:**
 - Turbidez do meio e alteração da cor para rosa (*Salmonella*)
- **Reacção negativa:**
 - Coloração amarela

✚ TSI (ISO – 6579: 2002):

- Semear a superfície do agár e inocular o fundo numa só picada;
- Incubar a 37°C ± 1°C durante 24 ± 3 horas;
- Nas culturas típicas de *Salmonella* apresenta a cunha alcalina (vermelha) e o fundo ácido (amarelo) com formação de gás e, em cerca de 90% formação de H₂S (escurecimento do agár).

✚ Indol

- Inocular o meio imediatamente abaixo da sua superfície;
- Incubar numa estufa a 37°C durante 24 horas;
- Após incubação, adiciona-se a cada tubo o reagente de Kovax;
- **Reacção positiva:**
 - Após agitação há formação de um anel de cor vermelha.
 - *E. coli*
- **Reacção negativa:**
 - Após agitação não há reacção nenhuma.
 - *Salmonella*

Todas as estirpes identificadas como sendo pertencentes ao género *Salmonella*, foram guardadas em meio de leite (Constituição em Anexo) para serem congeladas (-21°C) e, posteriormente re-utilizadas.

3.5. Determinação da sensibilidade a antibióticos

Para os isolados obtidos, analisou-se a sensibilidade a antibióticos utilizando o método de difusão em disco ou antibiograma, seguindo as normas do CLSI. O

antibiograma define a actividade *in vitro* de um antibiótico perante um determinado microrganismo e reflecte a sua capacidade para inibir o crescimento de uma bactéria ou população bacteriana (Fernández, 2006). Foram testados os seguintes antibióticos: ampicilina (AMP); amoxicilina + ácido clavulânico (AMC); cefoxitina (CTX); cefoxitin (FOX); ceftazidima (CAZ); aztreonam (AZT); imipenemo (IMP); gentamicina (GEN); amicacina (AK); tobramicina (TOB); estreptomicina (STR); ácido nalidixico (NAL); ciprofloxacina (CIP); trimetoprim-sulfametoxazol (SXT); tetraciclina (TET) e cloranfenicol (CHL).

Na tabela 3, enunciam-se os respectivos “Break-points” e concentrações usadas durante o procedimento experimental.

Tabela 3 - Concentração dos discos de antibióticos usados nos antibiogramas e “Break-points” dos halos de inibição, utilizados no presente estudo (CLSI, 2007).

Antibiótico	Carga por disco (µg)	“Break-points” dos halos de inibição (mm)		
		R	I	S
amoxicilina + ácido clavulânico (AMC)	20/10	≤13	14-17	≥18
ceftazidima (CAZ);	30	≤14	15-17	≥ 18
cefoxitina (CTX);	30	≤14	15-22	≥ 23
aztreonam (AZT);	30	≤15	16-21	≥ 22
cefoxitin (FOX);	30	≤14	15-17	≥ 18
Ampicilina (AMP)	10	≤13	14-16	≥17
Imipenemo (IMP)	10	≤13	14-15	≥16
Ciprofloxacina (CIP)	5	≤15	16-20	≥21
Gentamicina (GEN)	10	≤12	13-14	≥15
Tetraciclina (TET)	30	≤14	15-18	≥19
Amicacina (AK)	30	≤14	15-16	≥17
Tobramicina (TOB)	10	≤12	13-14	≥15
Estreptomicina (STR)	10	≤11	12-14	≥15
Ácido nalidíxico (NAL)	30	≤13	14-18	≥19
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	23,75	≤10	11-15	≥16
Cloranfenicol (CHL)	µg/1,25 30	≤12	13-17	≥18

Este método de difusão em agar foi realizado seguindo as normas do CLSI (2007). Assim o procedimento pode ser dividido em duas fases:

- Preparação do inóculo: semeou-se uma colónia, proveniente de uma placa com a estirpe pura, em BHI e incubou-se a 37°C, durante 24h. Desta placa, recolheram-se 1 a 2 colónias para 3 ml de solução salina esterilizada (NaCl a 0,9%) até se obter uma turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland.

- Inoculação da placa: com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada, semeou-se a superfície de uma placa de MH na sua totalidade de uma forma homogénea. Colocaram-se, de seguida e com a ajuda de uma pinça, os discos de antibiótico (até um máximo de 6 discos por placa). Incubaram-se as placas a 37°C durante 24h e mediram-se, posteriormente, os diâmetros dos halos de inibição.

3.6. Extração de DNA (adaptado de Riaño *et al.*, 2006)

O método tradicional de extração de DNA em enterobactérias não é eficaz para o estudo de *Salmonella* uma vez que, o DNA que se obtém apresenta muitas impurezas. Assim, neste trabalho, foi necessário recorrer a uma técnica de extração mais complexa que nos permitiu obter um DNA de elevada pureza e adequado para a sequenciação de diferentes fragmentos.

Coloca-se a crescer cada uma das estirpes num tubo de BHI líquido a uma temperatura de 37°C durante 12 horas. Recolhe-se 1 ml dessa solução para um eppendorf e centrifuga-se durante 10 minutos a 7000 r.p.m.. De seguida retira-se o sobrenadante, com 1 ml de água destilada resuspende-se a fracção bacteriana e, centrifuga-se novamente. Retira-se, novamente, o sobrenadante e resuspende-se o pellet com 500µL de tampão SET, 25µL de SDS a 20% e 1 µL de lisozima (50mg/ml). Deixa-se durante 1 hora a 37°C.

De seguida, adiciona-se 220 µL de NaCl 5M e 700 µL de clorofórmio e agita-se. Depois de uma nova centrifugação de 10 minutos a 10000 r.p.m. há formação de duas fases separadas. A fase superior é transferida para um eppendorf e adiciona-se 700 µL de isopropanol frio (-20°C). Mistura-se e deixa-se durante uma hora a -20°C.

Depois deste período a -20°C, centrifuga-se durante 10 minutos a 10000 r.p.m.. De seguida, retira-se o sobrenadante e junta-se 800 µL de etanol frio a 70% (-20°C). O etanol tem de ser depositado no eppendorf no lado oposto ao que se encontra o pellet. De seguida, procede-se a uma última centrifugação de 10000 r.p.m. durante 5 minutos.

Finalmente, retira-se o etanol, deixa-se secar e resuspende-se com 100 μL de água destilada.

3.7. Quantificação de DNA

A determinação da concentração e pureza de DNA extraído foi feita com o auxílio do aparelho NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc., USA). Após medido o branco com água esterilizada, inocularam-se 3 μL de DNA da amostra testada, a partir do qual o programa determinou a curva de absorvância do amostra 260nm. A pureza das amostras foi determinada pelo quociente de absorvância obtido a 260 e 280nm, o qual indica uma concentração pura entre os valores 1,8 a 2, diminuindo no caso de contaminação com proteínas.

3.8. Reacção em cadeia pela polimerase (PCR)

As reacções de PCR realizaram-se num termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) e os produtos de PCR foram posteriormente visualizados por electroforese em gel de agarose.

Na Tabela 4, estão descritos os componentes e as respectivas quantidades usadas em cada tubo de PCR. Cada tubo de PCR apresentou um volume final de 25 μL .

Tabela 4 - Componentes usados na técnica de PCR.

Componentes	Concentração stock	Volume por tubo
¹ Primer forward	25 μM	0,5 μl
¹ Primer reverse	25 μM	0,5 μl
Tampão de reacção NH ₄ (Bioline)	10 X	2,5 μl
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	0,75 μl
² dNTPs (Bioline)	100 mM	0,5 μl
BioTaq X polimerase (Bioline)	5U/ μl	0,15 μl
DNA	-----	5 μl
Água miliQ esterilizada	-----	15,1 μl

¹ Os *primers* de trabalho (25 μM) foram preparados a partir de um stock de 100 μM : 25 μl de primer + 75 μl H₂O.

² Os dNTPs foram preparados com 10 μl de cada um dos seguintes nucleótidos (dATP, dTTP, dCTP e dGTP) + 360 μl de H₂O.

É ainda necessário preparar, para cada reacção, três tubos de controlo: controlo sem DNA (tubo sem DNA ao qual se adicionaram 20µl de água miliQ esterilizada (Sigma)), o controlo sem “primers” (tubo sem primers ao qual se adicionaram 2 µl de água miliQ esterilizada (Sigma)) e o controlo positivo (da colecção de estirpes de *E. coli* da Universidade de La Rioja).

As tabelas seguintes apresentam os genes investigados, as sequências dos primers, as condições de amplificação e o tamanho dos fragmentos de DNA amplificados.

Tabela 5 – Primers utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes codificantes de β-lactamases .

Primers (sequência 5'→3')	Condições de amplificação			Referência (tamanho da banda obtida)
<i>bla</i> _{TEM} F: ACGCTCAGTGGAACGAAAAC R: TTCTTGAAGACGAAAGGGC	94°C	3 min.	1 ciclo	Belaouaj <i>et al.</i> , 1994 (1150 pb)
	94°C	1 min.		
	60°C	1 min.	30 ciclos	
	72°C	1 min.		
	72°C	3 min.	1 ciclo	
<i>bla</i> _{SHV} F: CACTCAAGGATGTATTGTG R: TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	96°C	15 seg.	1 ciclo	Pitout <i>et al.</i> , 1998 (885pb)
	96°C	15 seg.		
	52°C	15 seg.	24 ciclos	
	72°C	2 min.		
	72°C	3 min.	1 ciclo	
<i>bla</i> _{OXA-1} F: ACACAATACATATCAACTTCGC R: AGTGTGTTTAGAATGGTGATC	96°C	5 min.	1 ciclo	Steward <i>et al.</i> , 2001 (813pb)
	96°C	1 min.		
	61°C	1 min.	35 ciclos	
	72°C	2 min.		
	72°C	10 min.	1 ciclo	

Tabela 6 – *Primers* utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes resistência relacionados com a resistência ao cloranfenicol.

Primers (sequência 5'→3')	Condições de amplificação			Referência (tamanho da banda obtida)
	94°C	5 min.	1 ciclo	
<i>cmlA</i>				
	94°C	1 min.		Sáenz <i>et al.</i> , 2004 (455 pb)
F: TGTCATTTACGCCATACTCG	55°C	1 min.	30 ciclos	
R: ATCAGGCATCCCATTCCCAT	72°C	1 min.		
	72°C	7 min.	1 ciclo	

Tabela 7 – *Primers* utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes resistência relacionados com a resistência à tetraciclina.

Primers (sequência 5'→3')	Condições de amplificação			Referência (tamanho da banda obtida)
	95°C	5 min.	1 ciclo	
<i>tetA</i>				
	95°C	30 seg.		Sáenz <i>et al.</i> , 2004 (937 pb)
F: GTAATTCTGAGCACTGTTCGC	62°C	30 seg.	23 ciclos	
R: CTGCCTGGACAACATTGCTT	72°C	45 seg.		
	72°C	7 min.	1 ciclo	
	95°C	5 min.	1 ciclo	
<i>tetB</i>				
	95°C	30 seg.		Sáenz <i>et al.</i> , 2004 (416 pb)
F: CTCAGTATTCCAAGCCTTTG	57°C	30 seg.	25 ciclos	
R: CTAAGCACTTGTCTCCTGTT	72°C	20 seg.		
	72°C	7 min.	1 ciclo	

Tabela 8 – *Primers* utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes resistência relacionados com aminoglicósidos.

Primers (sequência 5'→3')	Condições de amplificação			Referência (tamanho da banda obtida)
<i>aac (3')-I</i> (confere resistência à gentamicina) F: AACCTACTCCCAACATCAGCC R: ATATAGATCTCACTACGCGC	94°C	5 min.	1 ciclo	Sáenz <i>et al.</i> , 2004 (169 pb)
	94°C	30 seg.	30 ciclos	
	60°C	45 seg.		
	72°C	2 min.		
<i>aac (3')-II</i> (confere resistência à gentamicina) F: ACTGTGAATGGGAATACGCGTC R: CTCCGTCAGCGTTTCAGCTA	94°C	5 min.	1 ciclo	Sáenz <i>et al.</i> , 2004 (237 pb)
	94°C	30 seg.	32 ciclos	
	60°C	45 seg.		
	72°C	2 min.		
<i>aadA</i> (confere resistência à estreptomicina) F: GCAGCGCAATGACATTCTTG R: ATCCTTCGGCGCGATTTTG	94°C	5 min.	1 ciclo	Madsen <i>et al.</i> , 2000 (282 pb)
	94°C	1 min.	35 ciclos	
	60°C	1 min.		
	72°C	1 min.		
	72°C	8 min.	1 ciclo	

Tabela 9 – *Primers* utilizados e condições utilizadas nas reacções de PCRs para a amplificação de genes resistência relacionados com a resistência ao sulfametoxazol.

Primers (sequência 5'→3')	Condições de amplificação			Referência (tamanho da banda obtida)
<i>sul1</i> F: TGGTGACGGTGTTCGGCATTTC R: GCGAGGGTTTCCGAGAAGGTG	94°C	5 min.	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (789 pb)
	94°C	30 seg.	30 ciclos	
	63°C	30 seg.		
	72°C	1 min.		
	72°C	8 min.	1 ciclo	

Tabela 10 – Primers utilizados e condições utilizadas para o estudo de integrons.

Primers (sequência 5'→3')	Condições de amplificação			Referência (tamanho da banda obtida)
<i>Int1</i> F: GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG R: ACATGGGTGTAAATCATCGTC	94°C	5 min.	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (483 pb)
	94°C	30 seg.	30 ciclos	
	62°C	30 seg.		
	72°C	1 min.		
	72°C	8 min.	1 ciclo	
Região variável de <i>Int1</i> F: GGCATCCAAGCAGCAAG R: AAGCAGACTTGACCTGA	94°C	5 min.	1 ciclo	Lévesque and Roy, 1993 (variável)
	94°C	1 min.	35 ciclos	
	55°C	1 min.		
	72°C	8 min.		
	72°C	8 min.	1 ciclo	
<i>Int2</i> F: CACGGATATGCGACAAAAAGGT R: GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	94°C	5 min.	1 ciclo	Mazel <i>et al.</i> , 2000 (788 pb)
	94°C	30 seg.	30 ciclos	
	62°C	30 seg.		
	72°C	1 min.		
	72°C	8 min.	1 ciclo	
Região variável de <i>Int2</i> F: CGGGATCCCGGACGGCATGCACGATTTGTA R: GATGCCATCGCAAGTACGAG	94°C	5 min.	1 ciclo	White <i>et al.</i> , 2001 (variável)
	94°C	1min.	35 ciclos	
	60°C	1 min.		
	72°C	6 min.		
	72°C	8 min.	1 ciclo	
<i>qacEAF/sulR</i> F: GGCTGGCTTTTTCTTGTTATCG R: GCGAGGGTTCCGAGAAGGTG	94°C	5 min.	1 ciclo	Saenz <i>et al.</i> , 2004 (1125 pb)
	94°C	30 seg.	30 ciclos	
	63°C	30 seg.		
	72°C	1 min.	1 ciclo	
<i>RVInt1/aadA</i> F: GGCATCCAAGCAGCAAG R: ATCCTTCGGCGGATTTTG	94°C	5 min.	1 ciclo	Madsen <i>et al.</i> , 2000
	94°C	1min.	35 ciclos	
	60°C	1min.		
	72°C	1 min.		
	72°C	1 min.	1 ciclo	

3.9. Electroforese em gel de agarose

Depois de recorrer à PCR, analisa-se o DNA amplificado recorrendo-se à técnica de electroforese.

Para a preparação do gel, pesou-se 1g de agarose D-1 (Pronadisa, Conda). A agarose foi colocada num frasco de vidro onde se adicionou 100ml de tampão TBE 1X (TBE 5X: 54g de Tris-base, 27,5g de ácido bórico e 20ml EDTA 0,5M pH=8 a partir de um stock de 250ml EDTA 0,5M pH=8). Colocou-se o frasco (com alívio da tampa) no microondas durante poucos minutos para dissolver a agarose. De seguida adicionou-se 5µl de Brometo de etídio (BioRad). A solução foi colocada num suporte de electroforese onde, previamente, foi colocado um pente de tamanho adequado, que criou os poços necessários para depósito de 10µl de produto de PCR misturado com tampão de carga (Em água destilada: 0,025g de azul de bromofenol, 0,025g de xileno cianol e 40% sacarose).

Depois de depositadas as amostras procedeu-se à electroforese. O suporte foi emergido numa tina de electroforese, cheia do mesmo tampão TBE 1X, e submetida a um campo eléctrico de 96 V, durante 45 minutos (tempo necessário para a completa separação dos fragmentos). Posteriormente, visualizaram-se as bandas obtidas com luz ultra-violeta e foram fotografadas mediante o uso de um sistema informático (GenSnap from SynGene).

3.10. Análise SDS-PAGE dos extractos proteicos

Solubilização de proteínas das células bacterianas

Cultivaram-se as células bacterianas até atingirem uma fase exponencial de crescimento. Depois, foi necessário centrifugar as células a 10.000 g durante 3 minutos, à mesma temperatura utilizada durante o crescimento das células.

O volume inicial foi de 10 ml de cultura, com uma densidade óptica de aproximadamente 0,5. Após centrifugação, o pellet bem visível foi resuspenso num volume igual de PBS pré-aquecido para ser centrifugado novamente.

Depois de se suspender o pellet em 0,2 ml de tampão de solubilização de SDS, fez-se a transferência do mesmo para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. De seguida,

realizou-se a sonicação da amostra recorrendo a um homogeneizador ultrasónico (seis vezes 10 pulses; intervalo: 1 Hz; duração do pulse: 0,3 segundos; 20 kHz homogeneous sound; power output: 60 W).

As células rompidas foram de seguida centrifugadas a uma velocidade máxima de centrífuga (14.000 g), durante 30 minutos a 4°C. Colheu-se o sobrenadante cuidadosamente em pequenas quantidades de 50 µl a -80°C.

Montagem das placas de electroforese SDS-PAGE

A montagem das placas da tina de electroforese é realizada de véspera, sem contudo apertar os parafusos. No próprio dia da migração electroforética, terminou-se a montagem das placas, apertou-se os parafusos e de seguida, fechou-se a base dos vidros, rodando os parafusos no mesmo sentido, evitando desta forma qualquer fuga. Por último, fez-se uma marca a 4 cm do topo dos vidros, colocando as placas (vidros+base) numa posição perfeitamente horizontal.

Preparação dos géis de acrilamida

Preparou-se um gel SDS-PAGE (T = 12,52% e C = 0,97%) de 16 cm x 18 cm, 1 mm de espessura e de 15 poços (Tabela 11).

Com o auxílio de uma seringa aspirou-se o gel do gobelé e depositou-se nas placas de vidro até à marca dos 4 cm.

Tabela 11 - Preparação dos géis de separação (quantidades referentes a 2 géis).

	SDS-PAGE	
	T = 12,52% C = 0,97%	T = 10,3% C = 1,3%
Acrilamida 40%	15,31 ml	12,54 ml
Bisacrilamida (Bis) 2%	3 ml	3,25 ml
Água bidestilada	10,5 ml	13 ml
Tampão Tris HCl pH = 8,8	18,8 ml	18,8 ml
	Desgaseificação	
SDS 10%	0,5 ml	0,5 ml
APS 1%	1,25 ml	1,25 ml
TEMED	25 µl	25 µl

De seguida, preparou-se o gel de concentração (T = 2,88 e C = 1,42%) (Tabela 12).

Tabela 12 - Preparação dos géis de concentração (quantidades referentes a 2 géis).

Gel de concentração (T = 2,88% C = 1,42%)	
Acrilamida 40%	1,68 ml
Bisacrilamida (Bis) 2%	0,49 ml
Água bidestilada	17,34 ml
Tris HCl pH = 6,8	2,81 ml
Desgaseificação	
SDS 10%	0,2 ml
APS 1%	1 ml
TEMED	22,5 µl

As amostras foram introduzidas nos poços com auxílio de uma seringa de ponta muito fina.

Depois de se introduzir o conjunto na tina de electroforese, ajustou-se o volume de tampão de electroforese. Tapou-se a tina de electroforese e ligou-se à fonte de alimentação. As condições de migração foram de 30 mA/gel a 14 °C.

Quando a frente de migração começou a sair das placas, parou-se a migração. De seguida, os géis foram colocados num recipiente com cerca de 400 ml (por gel) de solução de coloração, onde permaneceram 24 horas e em agitação.

Os géis foram descorar em água destilada durante uma noite e na manhã seguinte foram passados para uma solução de ácido tricloroacético (TCA) a 6%, onde permaneceram durante 5 horas. Posteriormente, foram colocados numa solução de glicerol a 5% onde permaneceram durante 2 horas.

Capítulo 4 - Resultados

Recorremos ao método de cultura microbiológica para pesquisa de *Salmonella* num total de 243 amostras fecais de animais de diferentes origens. As colónias sugestivas depois de isoladas foram analisadas através de provas bioquímicas para desta forma, confirmarmos a presença de *Salmonella*. Para algumas amostras de animais positivas foram isoladas mais do que uma colónia.

As amostras foram designadas por uma letra maiúscula correspondente à origem, um número do animal e, seguido entre parênteses um número correspondente à colónia.

Nesta investigação, das 77 amostras fecais de javali pertencentes a animais diferentes, foram isolados 17 animais positivos, dos quais foram obtidos 23 isolados. Relativamente às 77 amostras fecais de coelho, obtivemos 40 isolados pertencentes a 38 animais positivos. As amostras de porco bísaro foram as que apresentaram uma percentagem de animais positivos mais elevada uma vez que, a partir de 35 amostras fecais de porco bísaro pertencentes a diferentes animais, foram isolados 30 animais positivos dos quais se obtiveram 36 isolados para analisar. Ao contrário, as amostras de avestruz apresentaram uma percentagem de positividade muito baixa de 5,56% pois das 54 amostras fecais pertencentes a diferentes animais, inicialmente testadas, apenas obtivemos 3 positivos, dos quais testamos 5 isolados. Estes dados estão esquematizados na tabela 13.

Tabela 13 – Nº de amostras de amostras fecais analisadas e positivas e respectiva % de positividade para cada uma das origens analisadas.

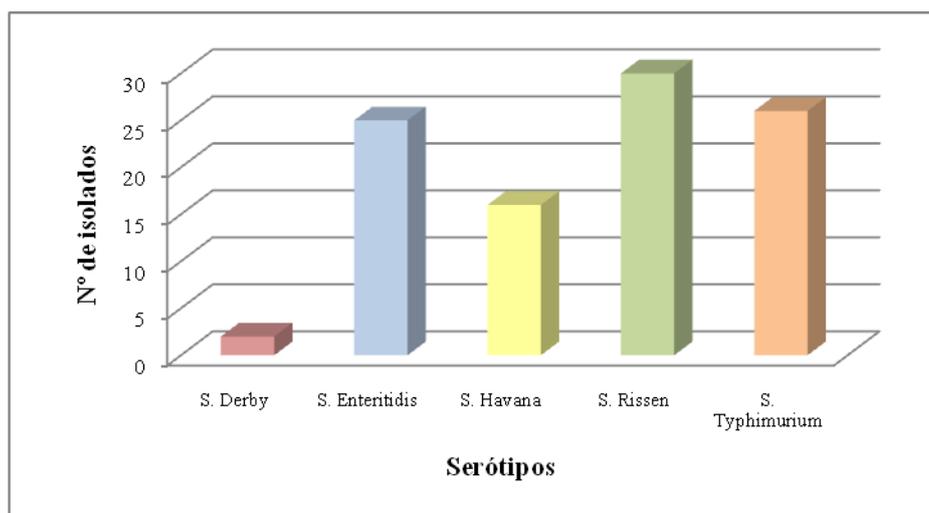
Origem (nº de amostras analisadas)	Nº de amostras positivas	% de positividade
Javali (77)	17	22,1%
Porco bísaro (35)	30	85,7%
Coelho selvagem (77)	38	49,4%
Avestruz (54)	3	5,56%

Desta forma, após confirmação bioquímica e sorológica das colónias sugestivas de *Salmonella* sp. isoladas pelo método descrito pela norma ISO 6579:2002, estas foram enviadas para o Laboratório Nacional de Investigação Veterinária (LNIV) para estas serem serotipificadas de acordo com o esquema Kauffmann-White (Popoff, 2001). Por uma questão de custos, apenas as amostras de avestruz não foram enviadas para serotipificação uma vez que apenas 3 das 54 amostras fecais resultaram positivas, no

total 5 isolados. Assim, achamos melhor aguardar pelos resultados dos testes de resistência para verificar se valeria a pena mandar então para análise no LNIV.

No nosso trabalho foram detectados 5 serótipos distintos. Através da serotipificação, foi-nos já possível encontrar algumas diferenças entre as diferentes origens animais. A distribuição dos serótipos pelos isolados totais está representada no gráfico 1.

Gráfico 1 – Distribuição dos diferentes serótipos pelos isolados de diferentes origens.



Tendo em conta o conjunto de isolados das diferentes origens, verifica-se que o serótipo mais detectado neste estudo foi *S. Rissen* uma vez que, dos 99 isolados analisados, foi detectado em 30. Seguido dos serótipos *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, que surgiram respectivamente em 26 e 25 dos isolados testados. No plano oposto, o serótipo *S. Derby* apenas foi detectado em uma das origens surgindo por isso em menor percentagem no gráfico 1.

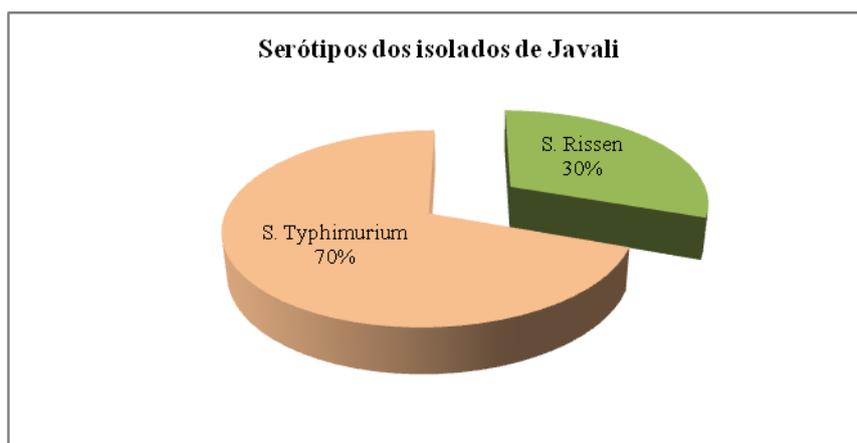
Apenas os serótipos *S. Rissen* e *S. Typhimurium*, foram detectados nas 3 origens animais (javali, porco bísaro e coelho bravo). Por sua vez, os serótipos *S. Enteritidis* e *S. Havana*, surgiram nos isolados de porco bísaro e coelho bravo. Relativamente, a *S. Derby*, foi detectado apenas em 2 isolados de coelho selvagem.

Depois de apresentar este gráfico com uma visão dos resultados da serotipificação para as amostras totais, é importante analisar as origens de uma forma individual para verificar as diferenças existentes relativamente aos serótipos detectados nas diferentes origens.

Desta forma, nos gráficos seguintes são apresentados os diferentes serótipos detectados nos isolados de javali, porco bísaro e coelho selvagem. Para isolados de

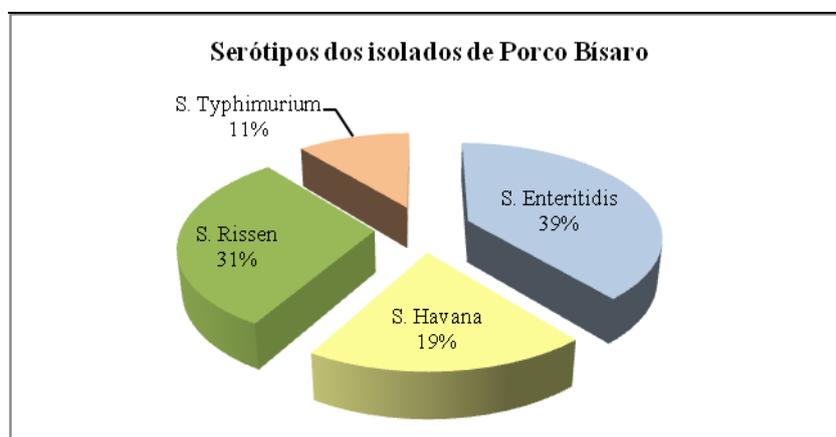
javali, apenas foram detectados 2 serótipos distintos: *S. Rissen* e *S. Typhimurium*. Tal como é possível observar através do Gráfico 2, o serótipo *S. Typhimurium*, representado a cor laranja, foi detectado em 16 isolados de Javali. Os restantes 7 isolados foram classificados como pertencentes aos serótipo *S. Rissen*, correspondendo desta forma aos 30% representados a verde no gráfico. Esta foi a origem que apresentou menor diversidade de serótipos.

Gráfico 2 – Serótipos detectados nos isolados de Javali.



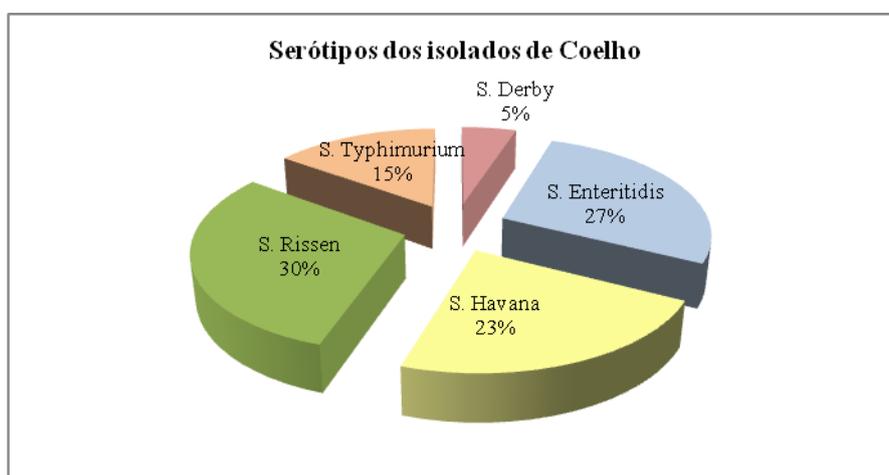
Tal como é possível observar no gráfico 3, os isolados de porco bísaro encontram-se distribuídos por 4 serótipos: *S. Enteritidis*, *S. Havana*, *S. Rissen* e *S. Typhimurium*. O maior número de isolados corresponde ao serótipo *S. Enteritidis*, detectado em 14 dos 36 isolados testados. Por sua vez, *S. Rissen* e *S. Havana*, foram detectados em 11 e 7 isolados, respectivamente. Finalmente, e ao contrário do que verificamos para os isolados de javali representados no gráfico anterior, *S. Typhimurium* foi o serótipo menos detectado nos isolados de porco bísaro.

Gráfico 3 – Serótipos detectados nos isolados de Porco Bísaro.



Finalmente, os 40 isolados de coelho selvagem do nosso trabalho, pertencem a *S. Derby*, *S. Enteritidis*, *S. Havana*, *S. Rissen* e *S. Typhimurium* (Gráfico 4). Nestas amostras surgiu o serótipo *S. Derby* não detectado nas restantes origens, ainda que em apenas 2 dos 40 isolados serotificados. Assim, esta foi a origem que apresentou uma maior diversidade de serótipos. Apesar do serótipo *S. Rissen*, tal como demonstrado no gráfico 1, ter sido o mais detectado a nível dos isolados totais, apenas nos isolados de coelho, surgiu com maior percentagem. De seguida surgem os serótipos *S. Enteritidis* e *S. Havana* detectados em 11 e 9 dos isolados, respectivamente. Finalmente, o segundo serótipo menos detectado nos isolados desta origem foi *S. Typhimurium* em apenas 6 dos isolados testados.

Gráfico 4 – Serótipos detectados nos isolados de Coelho Selvagem.



Apesar de o serótipo *S. Rissen* ter sido considerado, na nossa investigação, como sendo o serótipo mais identificado quando temos em conta as amostras totais, ao analisar as 3 origens individualmente, verificamos que cada uma apresenta um serótipo distinto como o mais frequente. Assim, em termos individuais, para os isolados de javali, divididos entre apenas dois serótipos, *Salmonella Typhimurium* representou o serótipo mais identificado. Por sua vez, para os isolados de porco bísaro foi o serótipo *Salmonella Enteritidis* enquanto que, para os isolados de coelho selvagem foi *Salmonella Rissen*.

O passo seguinte no nosso trabalho foi definir os fenótipos de resistência aos diversos antibióticos testados. Para tal, recorremos ao método do antibiograma utilizando 16 antibióticos. Os halos de inibição formados foram definidos como resistentes, intermédios e sensíveis, segundo as normas estabelecidas pelo CLSI.

Para cada uma das amostras, isolamos 2 ou 3 isolados. A grande maioria desses isolados, revelaram pertencer ao mesmo serótipo e apresentaram o mesmo fenótipo de resistência, como tal, apenas foi contabilizado um dos isolados por amostra. E neste caso, apenas um dos isolados prosseguiu para os seguintes passos do nosso estudo. Assim, como os isolados C22(1) e C22(2), pertencem ao mesmo animal e apresentaram o mesmo serótipo e as mesmas resistências, apenas C22(1) foi contabilizada. Do mesmo modo, para o isolado AVT14 apenas a colónia 1 foi contabilizada.

Na tabela 14, são apresentadas as resistências verificadas pelos isolados de javali e as percentagens de incidência correspondentes. Assim, dos 16 antibióticos testados, os isolados de javali apresentaram resistências a 5. A resistência mais observada foi à ampicilina ultrapassando os 90%. A resistência aos antibióticos cloranfenicol, estreptomicina e tetraciclina foi também verificada num grande número de isolados. Por outro lado, a resistência ao trimetoprim-sulfametoxazol apenas foi detectada em 5 isolados.

Depois de registarmos as resistências, analisamos individualmente cada isolado tendo em conta o perfil de resistências e o serótipo. Depois de uma breve organização de dados verificamos que podíamos estabelecer uma relação entre os serótipos e as resistências a alguns dos antibióticos. Desta forma, nos isolados de javali verificamos que todos os isolados *S. Typhimurium* apresentaram resistência à ampicilina e ao cloranfenicol e que, todos os isolados *S. Rissen* apresentaram resistência à tetraciclina mas não ao cloranfenicol.

É ainda de salientar que, apenas um dos isolados de javali não apresentou resistência a mais do que um antibiótico. O isolado J30 (2) pertencente ao serótipo *S. Rissen* apresentou resistência apenas à tetraciclina.

Tabela 14 – Resistências a antibióticos detectadas nos isolados de javali (nº de isolados = 23).

Antibióticos	N.º de resistências	% de resistências
Ampicilina (AMP)	21	91,3%
Tetraciclina (TET)	13	56,5%
Estreptomicina (STR)	15	65,2%
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	5	2,17%
Cloranfenicol (CHL)	16	69,6%

As resistências verificadas para os isolados de porco bísaro, são apresentadas na Tabela 15. Para estes isolados, foram detectadas resistências a 6 antibióticos distintos.

As resistências mais detectadas foram aos antibióticos tetraciclina, ampicilina e ácido nalidíxico.

É ainda de salientar que 3 isolados não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos testados. Dos 36 isolados analisados, 12 demonstraram resistência a apenas um dos antibióticos (neste caso ao ácido nalidíxico) sendo que, 8 pertenciam a *S. Enteritidis* e 4 a *S. Havana*.

Tal como nos isolados de javali, também nos isolados de porco bísaro, verificámos que existia uma relação entre o serótipo e as resistências a alguns antibióticos. Todos os isolados pertencentes a *S. Rissen* apresentaram resistência à AMP, TET, SXT enquanto que, os isolados testados pertencentes a *S. Typhimurium* apresentaram resistência à AMP, TET, STR, CHL. Verificamos que todos os isolados pertencentes ao serótipo *S. Enteritidis* apresentaram resistência ao ácido nalidíxico. Por sua vez, todos os isolados pertencentes ao serótipo *S. Havana* apenas apresentaram resistência ao ácido nalidíxico.

Tabela 15 – Resistências a antibióticos detectadas nos isolados de porco bísaro (nº de isolados = 36).

Antibióticos	N.º de resistências	% de resistências
Sem resistências	3	8,33%
Ampicilina (AMP)	20	55,6%
Tetraciclina (TET)	21	58,3%
Estreptomicina (STR)	13	36,1%
Acido Nalidixico (NAL)	20	55,6%
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	15	41,7%
Cloranfenicol (CHL)	6	16,7%

Os isolados de coelho foram os que apresentaram uma maior diversidade de resistências. As resistências aos antibióticos estreptomicina, tetraciclina e ampicilina foram as mais detectadas (Tabela 16). No entanto, foi também nesta origem que surgiram um maior número de isolados sem resistências. Dos 9 isolados de coelho que não apresentaram resistências, 6 pertenciam ao serótipo *S. Havana* e os restantes 3 a *S. Enteritidis*.

Os dois isolados pertencentes ao serótipo *S. Derby*, apresentaram o mesmo perfil de resistência a antibióticos (TET+STR). Por outro lado, todos os isolados de *S. Rissen* apresentaram resistência a AMP, STR e SXT enquanto que, todos os isolados de *S.*

S. Typhimurium foram resistentes a AMP, STR e CHL. Os isolados de *S. Enteritidis* por sua vez, apenas apresentaram em comum a resistência a NAL.

Tabela 16 – Resistências a antibióticos detectadas nos isolados de coelho selvagem (nº de isolados = 39).

Antibióticos	N.º de resistências	% de resistências
Sem resistências	9	23,1%
Amoxicilina + ácido clavulânico (AMC)	1	2,56%
Ampicilina (AMP)	20	51,3%
Gentamicina (GEN)	1	2,56%
Tetraciclina (TET)	21	53,8%
Amicacina (AK)	1	2,56%
Estreptomicina (STR)	23	59%
Ácido nalidixico (NAL)	10	25,6%
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	14	35,9%
Cloranfenicol (CHL)	6	15,4%

Para os isolados de avestruz, apenas foram testados 4 isolados nos quais, foram detectadas resistências a 4 antibióticos (Tabela 17). A resistência ao ácido nalidixico foi a mais detectada.

Tabela 17 – Resistências a antibióticos detectadas nos isolados de avestruz.

Antibióticos	N.º de resistências
Tetraciclina (TET)	1
Ácido nalidixico (NAL)	3
Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT)	1
Cloranfenicol (CHL)	1

Depois da explicação dos dados resumidos nas tabelas anteriores, onde se analisou cada uma das origens individualmente, é importante avaliar os resultados dos antibiogramas e a relação dos fenótipos de resistência a antibióticos e os respectivos serótipos, tendo em conta todos os isolados testados.

Assim, independentemente da origem, verificamos que todos os isolados identificados como *S. Typhimurium* apresentaram em comum, a resistência à ampicilina e ao cloranfenicol. Também a resistência à estreptomicina esteve presente na maioria dos isolados deste serótipo uma vez que, apenas 3 dos isolados *S. Typhimurium* de javali não apresentaram esta resistência.

Com a análise dos resultados obtidos verificamos, à exceção dos isolados de coelho, que todos os pertencentes ao serótipo *S. Rissen* apresentaram resistência à tetraciclina. Os isolados pertencentes a esse mesmo serótipo, apresentaram ainda, resistência à ampicilina em mais de 90%. No entanto, verificamos que nenhum desses isolados apresentou resistência ao cloranfenicol.

Relativamente aos isolados pertencentes ao serótipo *S. Enteritidis*, verificamos que todos apresentaram resistência ao ácido nalidíxico. Por sua vez, nos isolados de *S. Havana*, verificamos que apenas um dos isolados apresentou resistência a mais do que um antibiótico.

A Tabela 18 relaciona os serótipos de *Salmonella* com os fenótipos de resistência, a origem e o número de isolados, para desta forma termos uma melhor e mais fácil visualização dos resultados atrás descritos.

Tabela 18 – Fenótipos de resistência a antibióticos e a relação com os serótipos de *Salmonella* e a origem dos isolados.

Serótipos	Fenótipo de resistência	Origem e número de isolados		
		Javali	Bísaro	Coelho
S. Rissen (n = 30)	TET	1	-	-
	AMP-TET	1	-	-
	TET-SXT	1	-	-
	AMP-TET-STR	1	-	-
	AMP-TET-SXT	2	3	-
	AMP-STR-SXT	-	-	1
	AMP-TET-STR-SXT	1	6	9
	AMP-TET-NAL-SXT	-	1	-
	AMC-AMP-TET-STR-SXT	-	-	1
	AMP-GEN-TET-STR-SXT	-	-	1
AMP-TET-STR-NAL-SXT	-	1	-	
S. Typhimurium (n = 26)	AMP-CHL	3	-	-
	AMP-STR-CHL	6	-	1
	AMP-TET-STR-CHL	6	3	2
	AMP-STR-SXT-CHL	1	-	-
	AMP-TET-AK-STR-CHL	-	-	1
	AMP-TET-STR-NAL-CHL	-	-	1
S. Enteritidis (n = 24)	AMP-TET-STR-SXT-CHL	-	1	1
	NAL	-	8	4
	STR-NAL	-	-	2
	AMP-TET-NAL	-	1	-
	TET-NAL-SXT	-	1	-
	AMP-TET-NAL-SXT	-	2	1
	AMP-TET-S-NAL-CHL	-	2	-
Sem resistências	-	-	3	
S. Havana (n = 16)	NAL	-	4	2
	AMP-TET-STR-SXT	-	-	1
	Sem resistências	-	3	6
S. Derby	TET-STR	-	-	2

Legenda: ampicilina (AMP); amoxicilina + ácido clavulânico (AMC); cefoxitina (CTX); cefoxitin (FOX); ceftazidima (CAZ); aztreonam (AZT); imipenemo (IMP); gentamicina (GEN); amicacina (AK); tobramicina (TOB); estreptomina (STR); ácido nalidixico (NAL); ciprofloxacina (CIP); trimetoprim-sulfametoxazol (SXT); tetraciclina (TET) e cloranfenicol (CHL).

Depois de concluído o estudo de resistência aos antibióticos, extraímos DNA dos vários isolados para de seguida, realizarmos o estudo dos genes responsáveis por essas mesmas resistências recorrendo, para tal, à técnica da PCR. Tal estudo, só foi possível graças ao protocolo estabelecido com a Universidade de La Rioja, na Espanha.

Para os isolados que apresentaram resistência à ampicilina, foram testados os genes do tipo *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-I}. Todos os isolados foram negativos para estes testes, tal como podemos observar pela figura 6, com os resultados para o teste do gene *bla*_{OXA} onde, se verifica que as nossas estirpes são negativas e apenas o marcador e a estirpe positiva são visíveis.

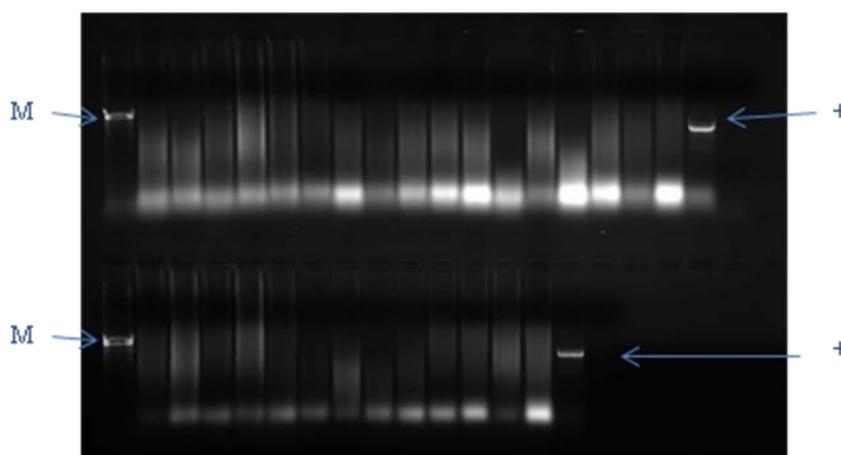


Figura 6 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos genes *bla*_{OXA}.
(Legenda: M _ Marcador de peso molecular; + _ Controlo positivo)

Os genes *tetA* e *tetB* foram testados para os isolados resistentes à tetraciclina. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 19 através da qual, podemos verificar que nenhum dos isolados apresentou o gene *tetB*. Por sua vez, o gene *tetA* apenas se encontrou presente nos isolados pertencentes ao serótipo *S. Rissen*.

Tabela 19 – Relação entre a resistência à tetraciclina e a presença dos genes *tetA* e *tetB*.

Origem	Serótipos	N.º de isolados		
		TET ^r	<i>tetA</i>	<i>tetB</i>
Javali	<i>S. Typhimurium</i>	5	0	0
	<i>S. Rissen</i>	6	4	0
Porco Bísaro	<i>S. Typhimurium</i>	3	0	0
	<i>S. Rissen</i>	10	5	0
	<i>S. Enteritidis</i>	5	0	0
Coelho selvagem	<i>S. Typhimurium</i>	5	0	0
	<i>S. Rissen</i>	11	2	0
	<i>S. Enteritidis</i>	1	0	0
	<i>S. Derby</i>	2	0	0
	<i>S. Havana</i>	1	0	0

Os genes *aac* (3')-I e *aac* (3')-II são responsáveis por conferir resistência à gentamicina. Assim, estes genes foram testados apenas para um dos nossos isolados uma vez que apenas C15(1) apresentou resistência a este antibiótico. O resultado foi negativo para ambos os genes, tal como podemos observar na figura 7.

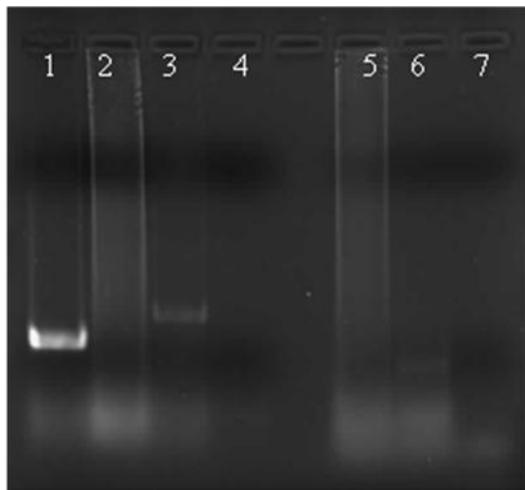


Figura 7 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de PCR dos genes *aac* (3')-I e *aac* (3')-II. (Legenda: 1_ Marcador de peso molecular; 2 e 5 _ C15(1); 3 e 6 _ Controlo positivo; 4 e 7_ Controlo negativo)

Por sua vez, gene *aadA* é responsável pela resistência à estreptomicina. Assim, verificámos a presença deste gene para todos os nossos isolados com resistência a este antibiótico. Tal como é possível verificar pelos resultados expostos na Tabela 20, 63,8% dos isolados STR^r surgiram positivos a este gene.

Tabela 20 – Relação entre a resistência à estreptomicina e a presença do gene *aadA*.

Origem	Serótipo	N.º de isolados	
		STR ^r	<i>aadA</i>
Javali	<i>S. Typhimurium</i>	11	10
	<i>S. Rissen</i>	2	2
Porco Bísaro	<i>S. Typhimurium</i>	3	2
	<i>S. Rissen</i>	6	6
	<i>S. Enteritidis</i>	2	1
Coelho selvagem	<i>S. Typhimurium</i>	6	2
	<i>S. Rissen</i>	12	5
	<i>S. Enteritidis</i>	2	1
	<i>S. Derby</i>	2	0
	<i>S. Havana</i>	1	1

A presença do gene *sul1* foi testada para todos os isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim. Verificamos que 60,6% dos isolados resistentes ao antibiótico referido apresentaram o gene *sul1*. Verificamos ainda que, os isolados que apresentaram o gene *sul1* apresentaram *qacEΔ1F/sulR* (Tabela 21).

Tabela 21 – Relação entre a resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim e a presença dos genes *sul1* e *qacEΔF/sulR*.

Origem	Serótipo	N.º de isolados		
		SXT ^r	<i>sul1</i>	<i>qacEΔF/sulR</i>
Javali	<i>S. Typhimurium</i>	1	1	1
	<i>S. Rissen</i>	4	4	4
Porco Bísaro	<i>S. Typhimurium</i>	1	1	1
	<i>S. Rissen</i>	10	9	9
	<i>S. Enteritidis</i>	2	1	1
Coelho selvagem	<i>S. Typhimurium</i>	1	4	4
	<i>S. Rissen</i>	12	0	0
	<i>S. Enteritidis</i>	1	0	0
	<i>S. Havana</i>	1	0	0

Para além do gene *sul1*, foram também testados os integrões do tipo 1 e 2, as regiões variáveis *Int11* e as regiões variáveis *Int11/aadA* para todos os isolados com resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim. Em nenhum dos 33 isolados com resistência

a este antibiótico, se detectou o integrão do tipo 2. No entanto, o *Int1* foi detectado em 75,8% desses isolados. Podemos salientar que todos os isolados de javali SXT^r apresentaram o integrão do tipo 1.

Na Tabela 22, foram registados os resultados referentes às regiões variáveis. Tal como seria de esperar, uma vez que se verificou a ausência de integrão do tipo 2 nos isolados em estudo, todos os isolados foram negativos para região variável *Int2*.

Por sua vez, a região variável *Int1*, foi testada para todos os isolados resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim e, verificamos a sua presença nos isolados positivos para *Int1* apenas com excepção de 4 isolados de coelho selvagem (3 *S. Rissen* e 1 *S. Enteritidis*) em que, apesar de positivos para *Int1*, revelaram-se negativos para a região variável. Dos 20 isolados com região variável *Int1*, verificamos que apenas 30% apresentaram integrão duplo.

Tabela 22 – Relação entre a resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim e a presença do integrão 1 e o tipo de região variável.

Origem	Serótipo	N.º de isolados							
				Região variável <i>Int1</i>			Região variável <i>Int1/aadA</i>		
		SXT ^r	<i>Int1</i>	Integrão duplo	1200pb	Neg	<i>aadA</i>	<i>aadA/dfA</i>	Neg.
Javali	<i>S. Typhimurium</i>	1	1	1	0	0	1	0	0
	<i>S. Rissen</i>	4	4	1	2	1	1	1	2
Porco	<i>S. Typhimurium</i>	1	1	1	0	0	1	0	0
Bísaro	<i>S. Rissen</i>	10	8	1	7	2	7	3	0
	<i>S. Enteritidis</i>	2	1	1	0	1	1	0	1
Coelho	<i>S. Typhimurium</i>	1	0	0	0	1	0	0	0
Selvagem	<i>S. Rissen</i>	12	8	0	5	7	3	2	7
	<i>S. Enteritidis</i>	1	1	1	0	0	1	0	0
	<i>S. Havana</i>	1	1	0	0	1	1	0	0

Escolhemos 14 isolados para análise monodimensional através de SDS-PAGE (Tabela 23). Pretendemos desta forma comparar isolados com origem, serótipo e perfil de resistência iguais, isolados de origens diferentes, igual serótipo e perfil de resistência e, isolados da mesma origem mas com serótipo e perfil de resistência distintas.

Tabela 23 – Perfis de resistência de *Salmonella* sp. nas diferentes amostras estudadas (Legenda: nd- Não determinado).

Poço	Isolado	Serótipo	Perfil de Resistência
1	J27 (1)	<i>S. Typhimurium</i>	AMP; TE; S; C
2	J32 (2)	<i>S. Typhimurium</i>	AMP; TE; S; C
3	C71 (1)	<i>S. Typhimurium</i>	AMP; TE; S; C
4	I40 (a)	<i>S. Typhimurium</i>	AMP; TE; S; C
5	B16 (1)	<i>S. Typhimurium</i>	AMP; TE; S; C
6	B20 (2)	<i>S. Enteritidis</i>	AMP; TE; S; NAL; C
7	B29 (2)	<i>S. Rissen</i>	AMP; TE; S; NAL; SXT
8	J45 (1)	<i>S. Rissen</i>	AMP; TE; SXT
9	B1 (1)	<i>S. Enteritidis</i>	AMP; TE; NAL; SXT
10	AVT14 (1)	n.d.	TE; SXT
11	C12 (1)	<i>S. Rissen</i>	AMC; AMP; TE; S; SXT
12	C16 (1)	<i>S. Typhimurium</i>	AMP; TE; AK; S; C
13	C40 (2)	<i>S. Typhimurium</i>	AMP; S; C
14		Marcador	
15	I57 (c)	<i>S. Enteritidis</i>	TOB; S

Através da análise electroforética, verificamos que os isolados com perfis de resistência distintos conferem ao nível da SDS-PAGE, bandas diferentes. Pelo contrário, os isolados pertencentes a diferentes origens mas perfis de resistência iguais apresentam perfis de bandas iguais. Esta comparação de perfis de bandas pode ser visualizada através da figura 8.

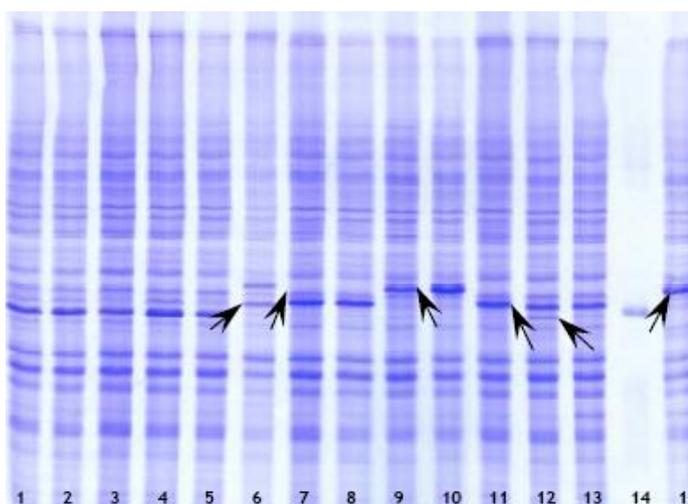


Figura 8 – Gel de SDS-PAGE dos extractos proteicos totais de *Salmonella* sp.

(Legenda: 1– J27(1); 2-J32(2); 3-C71(1); 4-I40(a); 5-B16(1); 6-B20(2); 7-B29(2); 8-J45(1); 9-B1(1); 10-AVT14(1); 11-C12(1); 12-C16(1); 13-C40(2); 14- Marcador; 15-I57(c).)

Assim, observando a imagem pode-se constatar que os cinco primeiros perfis de resistência são iguais e correspondem a isolados que apesar de diferentes origens, são pertencentes ao mesmo serótipo e com o mesmo perfil de resistência. Prova-se desta forma que o perfil de bandas não são influenciados pela origem.

Nos restantes poços foram colocadas amostras das várias origens que, apresentavam serótipos e perfis de resistência distintos. O resultado foram bandas distintas sendo que umas apresentavam mais ou menos diferenças em relação às outras.

Desta forma, podemos afirmar que a análise electroforética é considerada uma ferramenta complementar para a diferenciação de estirpes uma vez que, através deste estudo se confirma que, com a electroforese SDS-PAGE é possível a distinção de estirpes que apresentam diferentes perfis de resistência.

Capítulo 5 - Discussão

O Centro de Controlo de Doenças (CDC) nos EUA verificou que, das doenças transmitidas por alimentos causadas por bactérias patogénicas durante o período de 1973 a 1987, *Salmonella* sp. foi responsável por 42,3% dos surtos (Bean and Griffin, 1990). Por sua vez, em 1999, ficou registado que esta mesma bactéria era responsável por 51,3% dos surtos (Bean e Griffin, 1990). Mais tarde em 2005, nos Estados Unidos da América, verificou que mais de 50% de infecções alimentares provocadas por *Salmonella* sendo o serótipo Typhimurium responsável pela maior percentagem dos surtos (CDC, 2006). A respeito da mortalidade, estima-se ainda que em média 65 pessoas morrem, directa ou indirectamente desta infecção anualmente (Berends *et al.*, 1998). O nosso país não é excepção, tendo-se constatado que, entre 1992 e 2001, *Salmonella* sp. foi o principal responsável pelos surtos e casos de toxi-infecções alimentares (Novais, 2003).

Podemos afirmar que este trabalho por utilizar estirpes isoladas de animais selvagens, é inovador. Por sua vez, testes para animais de consumo realizam-se com frequência em todo o mundo, verificando a presença de *Salmonella* sp. numa grande percentagem de isolados (Wegener *et al.*, 1994; Baggesen *et al.*, 1996; Berends *et al.*, 1998). Uma vez que, os animais selvagens não estão em contacto directo com os antibióticos, seria de esperar que as nossas estirpes apresentassem uma baixa resistência a esses mesmos antibióticos. No entanto, à excepção dos isolados de avestruz, as restantes origens testadas apresentaram uma percentagem bastante elevada em relação ao apontado na bibliografia referente a estudos com animais de consumo.

Nesta investigação, foram analisadas 77 amostras fecais de javali, 77 amostras fecais de coelho, 35 amostras fecais de porco bísaro e 54 amostras fecais de avestruz. As amostras de porco bísaro foram as que apresentaram uma maior presença de *Salmonella* sp. uma vez que, das 35 amostras analisadas, 85,7% resultaram positivas. De seguida seguiram-se as amostras de coelho selvagem e javali, com percentagens de positividade de 49,4% e 22,1%, respectivamente. Finalmente, as amostras de avestruz apresentaram um resultado bastante afastado das restantes origens estudadas uma vez que, apenas foi detectada *Salmonella* em 3 amostras de avestruz.

Em estudos realizados com suínos abatidos para consumo em 2001, por Davies *et al.* e Sorensen *et al.* evidenciaram o isolamento de *Salmonella* sp. em 35 e 23% das amostras fecais analisadas, respectivamente. Um cenário semelhante foi também

verificado por Castagna *et al.* (2004), que detectou *Salmonella* em 61% das amostras fecais de suínos analisadas. Mais tarde, em 2006, o cenário foi também semelhante onde, 27,7% das amostras fecais analisadas de porcos para consumo, revelou presença de *Salmonella* (Vieira-Pinto, 2006).

Por sua vez, estudos idênticos realizados com frangos de consumo, revelaram igualmente, taxas elevadas de presença de *Salmonella* superando os 50%, considerando-se impróprios para consumo (Tirolli and Costa, 2006). Nos estudos realizados em Espanha por Capita *et al.* (2003) e, no Brasil por Almeida *et al.* (2000), também com frangos de consumo registaram-se taxas de positividade de 55% e 86,7%, respectivamente.

Segundo Vieira-Pinto (2006), a identificação dos serótipos dos isolados de *Salmonella* sp. é fundamental para conhecer o potencial impacto não só, na saúde pública mas, também, animal uma vez que o grau de patogenicidade é variável entre serótipos. Além disso, permite estabelecer comparações entre os diferentes serótipos detectados neste trabalho e os identificados nos casos de toxi-infecções alimentares.

Na nossa investigação foram detectados 5 serótipos distintos: *S. Typhimurium*, *S. Rissen*, *S. Enteritidis*, *S. Havana* e *S. Derby*. Tendo em conta as diferentes origens (javali, porco bísaro e coelho bravo) verificou-se que, apenas os serótipos *S. Rissen* e *S. Typhimurium*, foram detectados em todas. Por sua vez, os serótipo *S. Enteritidis* e *S. Havana*, surgiram nos isolados de porco bísaro e coelho bravo.

Salmonella Derby, é considerado por diversos autores como um serótipo muito isolado em suínos (Davies *et al.*, 1999). No entanto, no nosso trabalho, os únicos 2 isolados pertencentes a este serótipo, foram isolados a partir de amostras fecais de coelho.

Nos isolados de javali, divididos entre apenas dois serótipos, *Salmonella* Typhimurium representou o serótipo mais identificado. Este serótipo é considerado por vários autores como o serótipo de origem alimentar que se encontra com maior frequência em amostras de suínos, em todo o mundo (Jay, 2000; Olsen *et al.* 2001; Mukesh & Mukesh, 2002). Também em Portugal, segundo Machado *et al.* (1999), este foi considerado o serótipo mais identificado em amostras de suínos.

No entanto, analisando os isolados numa visão global, *S. Rissen* foi o serótipo mais identificado contrariando, tal como foi já referido atrás, vários autores que descrevem *S. Typhimurium* como o serótipo mais detectado em suínos (Davies *et al.*, 2000; Giovannacci *et al.*, 2001; Castagna *et al.*, 2004) ao contrário da ocorrência de

Salmonella Rissen que de uma forma geral, surge reduzida em várias investigações (Castagna *et al.*, 2001; Ranucci *et al.*, 2004).

O mesmo se verificou com amostras ambientais e clínicas num estudo semelhante realizado por Antunes *et al.* (2006), onde se verificou a grande predominância (61%) do serótipo *S. Typhimurium*, seguido do serótipo *S. Enteritidis* surgindo o serótipo *S. Rissen* em apenas 9% dos casos.

Por sua vez, num estudo semelhante utilizando alimentos, *S. Enteritidis* foi considerado o segundo serótipo mais detectado (Landgraft & Franco, 1996). Actualmente, na Europa este é o principal serótipo isolado em produtos avícolas e amostras clínicas de pacientes com gastroenterites devido a surtos alimentares (Capita *et al.* 2000; Olsen *et al.* 2001).

Analisando os resultados da serotipificação tendo em conta os dados de natureza epidemiológica, verificámos que os isolados positivos correspondentes a um mesmo animal apresentaram sempre o mesmo serótipo de *Salmonella* sp., o que nos levou a concluir que estivessem afectados pela mesma estirpe. Tal, só não foi verificado para os isolados de porco bísaro B30(1) e B30(2) que, embora pertencentes ao mesmo animal o primeiro pertence ao serótipo *S. Typhimurium* e o segundo a *S. Rissen* e, nos isolados de coelho selvagem C41(1) e C41(2) pertencentes a *S. Typhimurium* e *S. Rissen*, respectivamente.

Foi possível estabelecer uma relação entre os diferentes serótipos detectados e a resistência a determinados antibióticos. A resistência à ampicilina, cloranfenicol e estreptomicina foi detectada em todos os isolados pertencentes ao serótipo *S. Typhimurium*. Por sua vez, o serótipo *S. Rissen* apresentou sempre resistência à ampicilina e à tetraciclina embora nunca ao cloranfenicol. Algumas das relações verificadas no nosso estudo foram, também, detectadas na investigação de Fernández (2006) onde, se verificou que os isolados pertencentes ao serótipo *S. Typhimurium* apresentaram sempre resistência à estreptomicina e ao cloranfenicol enquanto que, a resistência à ampicilina, foi detectada em 100% dos isolados de *S. Rissen*.

Tendo em conta a origem dos isolados testados neste trabalho, a presença de fenótipos de multiresistência (68,3%), foi também um ponto surpreendente nesta investigação. Apenas 19,8% dos isolados apresentou resistência a um único antibiótico e 11,9% dos isolados não apresentou resistência a nenhum dos antibióticos. Por sua vez, numa investigação realizada por Antunes *et al.* (2006) verificou-se que, 33% de isolados apresentavam resistência a um único antibiótico.

É importante ter em conta que *S. Typhimurium* é considerado o serótipo mais virulento tanto para o ser humano como para os animais e, o que apresenta maior taxa de resistência (Botteldoorn *et al.*, 2004). No nosso estudo, *S. Rissen* e *S. Typhimurium* apresentaram uma elevada taxa de resistências a antibióticos apresentando perfis de multirresistência e, verificando-se que todos os isolados pertencentes a estes dois serótipos apresentaram resistência a pelo menos um dos antibióticos testados.

Este resultado não é totalmente inesperado, pois a multirresistência tem sido apresentada em alguns serótipos de *Salmonella* como *S. Typhimurium* (Ribot *et al.*, 2002) e *S. Enteritidis* (Cardoso *et al.*, 2006).

Apesar de nenhum dos isolados ter apresentado resistência a β -lactâmicos (à excepção de C12(1) que, apresentou resistência à AMC), utilizou-se a técnica da PCR para analisar a presença de genes de β -lactamases do tipo TEM, SHV e OXA. No entanto, os resultados destes testes resultaram negativos para todos os isolados testados. O inverso foi verificado num estudo em que, uma elevada percentagem das estirpes apresentavam o gene TEM e, por sua vez, o gene SHV foi identificado em 11,1% das estirpes analisadas (Fernández, 2006).

A resistência à ampicilina foi verificada num elevado número dos isolados analisados uma vez que, esta resistência foi revelada em 60,4% dos isolados testados. Delicato *et al.* (2004), investigou o perfil de resistência a antimicrobianos de estirpes de *Salmonella* isoladas de infecções humanas, sendo que a maior percentagem (85,7%) de resistência foi observada em relação à ampicilina.

A elevada resistência à ampicilina foi também registada noutros estudos semelhantes em que, a resistência a este antibiótico foi registada em 67,3% (Bokany *et al.*, 1990) e 86,2% (Cortez *et al.*, 2006) dos isolados de *Salmonella* sp. de aves.

No nosso trabalho, a resistência ao ácido nalidíxico foi verificada em trinta e três (32,4%) isolados. Esta resistência ao ácido nalidíxico tem sido observada por outros autores (Mayrhofer *et al.*, 2004; Antunes *et al.*, 2003; Calixto *et al.*, 2002). No entanto, Carraminãna *et al.* (2004), Fernandes *et al.* (2003) e Oliveira *et al.* (2005) verificaram mais de 90% de sensibilidade ao ácido nalidíxico de *Salmonella* isolada de animais de consumo e humanos.

A resistência à tetraciclina foi verificada para todos os isolados das diferentes origens testadas e com elevada percentagem (54,5%). Num outro estudo semelhante, utilizando isolados de *Salmonella* de suínos, a resistência à tetraciclina (37,4%) foi a segunda resistência mais detectada (Castagna *et al.*, 2001). Percentagens ainda mais

elevadas, foram verificadas num estudo realizado com frangos (Rezende *et al.*, 2005) e com aves (Cortez *et al.*, 2006) em que, a resistência a este antibiótico foi detectada em 84,2% e 72,4% dos isolados, respectivamente.

Em estudos anteriores, tanto em animais de companhia como animais selvagens, foram descritos como predominantes na resistência à tetraciclina, os genes *tet* (Costa *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008). Desta forma, na nossa investigação, para todos os isolados com resistência à tetraciclina, foram testados os genes *tetA* e *tetB*. No entanto, nenhum dos isolados apresentou o gene *tetB* enquanto que, o gene *tetA* apenas se encontrou presente nos isolados pertencentes ao serótipo *S. Rissen*.

Segundo alguns autores existem 8 genes *tet* sequenciados (Schwarz *et al.*, 2001). Desta forma, e tendo em conta os resultados descritos para além dos dois genes analisados, deveríamos analisar os restantes genes *tet*. Devido à falta de tempo, foi-nos impossível testar todos os genes. Numa investigação levada a cabo por Fernández (2006) foram testados os genes *tetC* e *tetD* nos isolados com resistência à tetraciclina.

Relativamente à resistência à estreptomicina, esta foi registada em 51,5% dos isolados testados, contrariando desta forma o verificado em investigações com suínos em que, apenas 14,1% dos isolados de *Salmonella* apresentaram resistência a este antibiótico (Castagna *et al.*, 2001). O mesmo foi verificado, numa investigação com frangos em que esta mesma percentagem não foi além dos 5,3% (Rezende *et al.*, 2005).

Para os isolados resistência à estreptomicina, foi testado a presença do gene *aadA*. Verificou-se que dos isolados resistentes à estreptomicina, 63,8% apresentaram o gene *aadA*. Em investigações recentes com animais de consumo e humanos, verificou-se que o gene *aadA* conferia resistência à estreptomicina, de tal forma que surgiu numa percentagem bastante elevada (83,33%) (Fernández, I., 2006).

Por sua vez, a resistência ao cloranfenicol também foi verificada neste trabalho numa percentagem de 28,7%. Uma percentagem um pouco mais inferior (16,1%), foi registada numa investigação de Castagna *et al.* (2001) em isolados de suínos. Por sua vez, num estudo de Cortez *et al.* (2006), verificou-se para estas bactérias, uma percentagem de resistência próximo dos 50% em amostras com aves enquanto que, mais recentemente, esta resistência foi a mais detectada, em 94,1% dos isolados testados (Conceição *et al.*, 2007).

A presença de resistência à gentamicina apenas foi verificada no isolado de coelho selvagem identificado como C15(1). Esta baixa incidência foi também verificada noutro estudo onde, 96,5% das amostras de aves apresentaram sensibilidade à

gentamicina (Cortez *et al.*, 2006). Santos *et al.* (2000), numa pesquisa de *Salmonella* sp. em amostras de carcaças de frango congeladas, verificaram também uma baixa resistência a este antibiótico.

A resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim foi registada em 35,6% dos isolados testados sendo, por isso, a quarta resistência mais detectada neste trabalho. Em investigações realizadas em animais de consumo e humanos saudáveis, a percentagem de resistência a esse mesmo antibiótico foi de 47% (Riaño *et al.*, 2006). Por sua vez num outro estudo de Antunes *et al.* (2006), realizado com amostras alimentares, de clínica e do ambiente, a resistência ao SXT foi verificada em 24% dos isolados.

A resistência ao SXT associada à resistência à ampicilina e tetraciclina foi a mais prevalente neste estudo, sendo a resistência à estreptomicina e ao cloranfenicol as que menos surgiram nos nossos isolados resistentes ao SXT. Num estudo semelhante, a resistência a SXT surge na sua maioria associada à resistência a ampicilina, tetraciclina e estreptomicina (Antunes *et al.*, 2006). Por sua vez, na investigação de Peirano (2005), a resistência ao SXT surgiu associada à estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e ácido nalidíxico.

No nosso trabalho, a relação entre a resistência ao SXT e a presença do gene *sul1*, foi sempre entre 90 e 100%. No trabalho de Fernández (2006), com isolados de animais de consumo e humanos, essa relação foi de 88,8%. No entanto, outros estudos realizados revelam que a resistência ao SXT é mediada pelos genes *sul2* e *sul3* (Peirano, 2005).

Tal como já foi referido anteriormente, a localização de genes de resistência em elementos genéticos móveis torna possível a transmissão de resistência entre bactérias. Os integrões são um tipo de elemento genético dinâmico de especial importância.

Assim, analisou-se através da PCR a sequência de genes de integrões do tipo 1 e do tipo 2. De seguida, para assegurar a presença ou não dos integrões procedeu-se à amplificação das regiões variáveis.

No nosso trabalho, o *Int1* foi detectado em 75,8% desses isolados ao contrário do integrão do tipo 2 que não foi detectado em nenhum dos isolados testados. Como é evidente, verificámos a ausência da região variável *Int2*.

Os testes a nível da proteómica são considerados por alguns autores, quando se pretende provar a relação entre o genoma dos microrganismos analisando os perfis proteicos representativos das características fenotípicas (Hook *et al.*, 1991).

Neste trabalho, verificamos que os isolados com diferentes perfis de resistência conferem ao nível da SDS-PAGE, bandas marcadamente distintas. Por outro lado, os isolados de origem distintas e perfis de resistência iguais também foram comparados e, verificamos que estes apresentam perfis de bandas iguais. Em estudos realizados anteriormente, os resultados indicam tal como neste trabalho que, através da análise dos perfis proteicos é possível verificar quais as espécies mais próximas ou mais afastadas umas em relação às outras (Hook *et al.*, 1991).

Apesar de este tipo de metodologia em *Salmonella* isolada de animais selvagens, ser pioneiro, existem já vários trabalhos publicados sobre investigações realizadas com esta técnica. Foram já vários os autores que, analisaram as resistências a antibióticos através do estudo de proteomas, diferenciando as suas características recorrendo à técnica de electroforese (Merquior *et al.*, 1991; Miranda *et al.*, 1991; Giard *et al.*, 2001)

Por exemplo, num estudo de Martinez and Collins (1991), onde se pretendia distinguir diferentes espécies de *Enterococcus*, recorreu-se à proteómica e foi possível verificar as diferenças entre elas e inclusive, considerar a espécie *E. faecium* como a mais afastada das restantes espécies.

Assim, podemos afirmar, tal como outros investigadores que, a proteómica é um instrumento adicional para a caracterização e distinção entre espécies o que, normalmente é difícil de diferenciar através de testes fisiológicos (Merquior *et al.*, 1994).

É importante salientar que neste trabalho apenas foi efectuada electroforese monodimensional, via SDS-PAGE. Em estudos futuros seria importante tratar estes resultados agora obtidos ao nível da electroforese bidimensional com sequenciação via MALDI-TOF (análise proteómica).

Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas

Os resultados apresentados no decorrer deste trabalho, comprovam a presença de diferentes serótipos de *Salmonella* sp. em distintas origens animais e com perfis de resistência a diferentes antibióticos. Além disso, os isolados apresentaram uma diversidade de genes responsáveis por essas mesmas resistências.

Desta forma, no final desta investigação, podemos referir como principais conclusões:

- As amostras provenientes de porco bísaro foram as que evidenciaram um maior número de isolados de *Salmonella* sp., o que vai de encontro com resultados de investigações anteriores com animais de consumo e domésticos.

- Apesar da presença de *Salmonella* sp. ter sido pouco detectada nos isolados de avestruz, nas restantes amostras de animais silvestres (javali e coelho selvagem) estudadas a presença de *Salmonella* foi detectada em percentagem superior a 20%.

- Nesta investigação foram detectados 5 serótipos distintos. Os resultados da serotipificação são também um pouco preocupantes uma vez que, os serótipos *Salmonella* Rissen e *Salmonella* Typhimurium, classificados como dos mais virulentos para o Homem, foram os mais detectados.

- Outro dado preocupante é o facto de os isolados pertencentes a estes dois serótipos apresentarem uma elevada taxa de resistências a antibióticos evidenciando perfis de multirresistência.

- Para além da colonização dos animais por *Salmonella* sp., as estirpes manifestaram resistência a vários antibióticos. O aparecimento de isolados de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos é indicativo da necessidade de maior controlo no uso desses fármacos.

- Foram detectados genes responsáveis por resistência a diferentes antibióticos. No entanto seria importante, num estudo futuro continuar com os estudo de genes para estes isolados. Nomeadamente, poder-se-ia estudar mais genes do tipo *tet* e *sul*.

- A presença destes genes é, responsável pela rápida disseminação de resistências.

- Relativamente ao estudo de integrões, verificou-se que os isolados que apresentam integrões possuem resistência a vários antibióticos.

- A análise electroforética revelou-se ferramenta indispensável para complementar a informação relativa à diferenciação de estirpes uma vez que, através deste estudo, se confirma a possibilidade de distinção de serótipos que apresentam perfis de resistência diferentes. Tal foi verificado através da análise dos géis de electroforese SDS-PAGE, onde foi possível visualizar perfis proteicos nitidamente distintos, para isolados com perfis de resistência diferentes.

Tendo em conta estes resultados seria importante continuar com este tipo de investigações uma vez que, apesar de animais selvagens, estes são muitas vezes caçados para alimentação.

Para combater este problema de multirresistência aos antibióticos é necessário um esforço global e de consciencialização da população sobre as consequências de aquisição de resistência dos microrganismos aos antibióticos.

Assim, torna-se importante e necessário um estudo mais profundo sobre a resistência a antibiótico e sobre os mecanismos responsáveis pela sua evolução e dispersão. Só desta forma será possível no futuro, um controlo mais eficaz da evolução da resistência bacteriana aos antibióticos.

No futuro, pretende-se ainda continuar com a análise dos isolados a nível molecular para caracterizar os mecanismos de resistência a antibióticos assim como proceder à conclusão da análise proteómica das estirpes de modo a melhor entender a epidemiologia e consequências nefastas em termos de saúde pública no que respeita aos factores que afectam a ocorrência, emergência e disseminação de resistências. Tais estudos foram impossíveis de concluir para esta tese de dissertação de mestrado devido à limitação de tempo.

Capítulo 7 - Referências Bibliográficas

Aarestrup, F. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among animals. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 12: 279-285.

Almeida, I., Gonçalves, P., Franco, R. and Carvalho, J. 2000. Isolamento e identificação de *Salmonella* em carcaças de frango congelados e frescos, através de método rápido. *Higiene Alimentar*. 14(70): 59-62.

Anadon, A., Marinez-Larranaga, M. and Martinez, M. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment; *Regulatory Toxicology and Pharmacology*.

Angulo, F., Baker, N., Olsen, S., Anderson, A. and Barret, T. 2004. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Sem Pediatr Infect Dis*. 15 (2): 78-85.

Anjos, F. 2006. Algumas alternativas aos antibióticos promotores do crescimento em nutrição animal. Impacto económico relativo à proibição do uso de antibióticos como promotores do crescimento, I Seminário da Federação Portuguesa de Suinicultores; Batalha, Portugal.

Antunes, P., Réu, C., Sousa, J., Peixe, L. and Pestana, N. 2003. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol*. 82: 97-103.

Antunes P., Machado J. e L. Peixe. 2006. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother*. 58: 297–304.

Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N. and Ohta, M. 1995. A novel integron-like element carrying the metallo- β -lactamase gene blaIMP. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39: 1612-1615.

Araújo, A. 1996. *Segurança Alimentar. Os perigos para a saúde através dos alimentos*. Meribérica/Liber Editores S. A. Lisboa. 453 Pp.

Arnold, T., Scholz, H., Marg, H., Rosler, U. and Hensel, A. 2004. Impact of *invA*-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of *Salmonella* in

the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. Journal of Veterinary Medicine Séries B. 51: 459-463.

Baggesen, D., Wegener, H., Bager, F., Stege, H. e Christensen, J. 1996. Herd prevalence of *Salmonella enterica* infections in Danish slaughter pigs determined by microbiological testing. Prev. Vet. Med. 26: 201-213.

Baird-Parker, A. 1994. Foods and microbiological risks. Microbiology. 140: 687-695.

Bajanca-Lavado, M. 1996. Contribuição para o estudo da susceptibilidade aos antibióticos e dos mecanismos de resistência em estirpes de *Haemophilus influenzae* isoladas em Portugal. Tese de Doutoramento. Instituto de Ciência Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, Portugal. Pp.: 102-113.

Barbour, W. and Tice, G. 1997. Genetic and Immunologic techniques for detecting foodborne pathogens and toxins. Food Microbiology. 39: 710-727. Edited by Doyle, M., Larry, R. and Monteville, T. ASM Press. Washington D.C.

Bean, N. and Griffin, P. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973 –1987: pathogens, vehicles and trends. Journal of Food Protection. 53: 804-817.

Beckers, H., Van Leusden, F., Roberts, D., Pietzsch, O., Prices, T., Van Schthorsts, M., Tips, P., Vassiliadis, P. and Kampelmacher, E. 1985. Collaborative study on the isibody immobilization on isolation of *Salmonella* from artificially contaminated milk powder. Journal of Applied Bacteriology. 59: 35-40.

Beckers, H., Heide, J., Fenigsen-Narucka, U. and Peters, R. 1987. Fate of *Salmonella* and competing flora in meat sample enrichments in buffered peptone water and in Muller-Kauffmann's tetrathionate medium. Journal of Applied Bacteriology. 62: 97-104.

Belaouaj, A., Lapoumeroulie, C., Canica, M., Vedel, G., Nevot, P., Krishnamoorthy, R. and Paul, G. 1994. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like β -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). FEMS Microbiology Letters. 120: 75-80.

Berends, B., Van Knapen, F., Mossen, D., Burt, S. and Snijders, J. 1998. Impact on human health of *Salmonella* spp. on pork in the Netherlands and the anticipated effects of some currently proposed strategies. Int. J. Food Microbiology. 44: 219-229.

Bernardo, M. and Machado, J. 1990. Incidência de *Salmonella* em animais de talho em Portugal. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 85(495): 94-101.

Blackburn, C. 1993. Rapid and alternative methods for the detection of *Salmonella* in foods. Journal of Applied Bacteriology. 12: 199-214.

Blahe, T. 2001. Pre-harvest Food safety as integral Part of Quality Assurance. Systems in Pork Chain from “Stable to Table”. Proceedings of the 4th Int. Symp. on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other food borne pathogens in Pork. Leipzig. Germany: 7-13.

Bokany, R., Stephens, J. and Foster, D. 1990. Isolation and characterization of salmonella from broiler carcasses or parts. Poultry Science 69: 592-598.

Bongers, J., Franssen, F., Elbrs, A. and Tielen, M. 1995. Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolates from the faecal flora of veterinarians with different professional specialities. 17: 146-149.

Botteldoorn, N., Herman, L., Rijpens, N. and Heyndrickx, M. 2004. Phenotypic and molecular typing of *Salmonella* strains reveals different contamination sources in two commercial pig slaughterhouse. Applied and Environmental Microbiology. 70(9): 5305-5314.

Bradford, P., Yang Y., Sahn D., Grope I., Gardovska, D. and Storch, G. 1998. CTX-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing b-lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. Antimicrob. Agents Chemother. 42: 1980-1984.

Bryen, L. 1988. General mechanisms of resistance to antibiotics. J Antimicrob Chemother. 22: 1-15.

Calixto, A., Serafini, A., Kipnis, A. and André, M. 2002. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos, em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. Hig Alim. 16(101): 56-62.

Calva, E. 2005. *Salmonella* Typhi y la fiebre tifoidea: de la biología molecular a la salud pública. Capítulo 4. In Microbios Edited by Esperanza Martinez Romero. Fonte: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap4>.

Capita, R., Alonso-Calleja, C., Garcia-Linares, M., Moreno, B. and Garcia-Fernández, M. 2000. *Salmonella* y salmonelosis humana. Alimentaria. 313: 91-98.

Capita, R., Alvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. and Garcia-Fernández, M. 2003. Occurrence of Salmonellae in retail carcasses and their products in Spain. Journal of Food Microbiology. 81: 169-173.

Carattoli, A. 2001. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Veterinary Research*. 32: 243-259.

Cardoso, M., Ribeiro, A., Santos, L., Pilotto, F.; Moraes, H., Salle, C., Rocha, S. and Nascimento, V. 2006. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37: 299-302.

Carramiñana, J., Rota, C., Agustín, I. and Herrera, A. 2004. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet Microbiol*. 104: 133-39.

Castagna, S., Bessa, M., Carvalho, D., Cardoso, M. and Costa, M. 2001. Resistência a antimicrobianos de amostras de *Salmonella* sp. isoladas de suínos abatidos no estado do Rio Grande do Sul. *Arquivos da Faculdade de Veterinária*. 29(1): 44-49.

Castagna, S., Schwartz, P., Canal, C. e Cardoso, M. 2004. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 56: 300-306.

CDC. 2002. Center for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria: annual report.

CDC - Center for Disease Control. 2006. Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly through Foods – 10 States, United States, 2005. *Morbidity and Mortality Weekly Report*. 55(14): 392-395.

Clark, C., Purins, L., Kaewrakon, P., Focareta, T. and Manning, P. 2000. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiology*. 146: 2605-2612.

CLSI. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement Approved Standard M100-S17. CLSI, Wayne, PA, USA. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coelho, A. 2001. *Ciência Hoje*. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Pp.170.

Conceição, R., Hentges, A., Moreira, A., Vasconcellos, F., Ângelo, I., Carvalhal, J., Aleixo, J. and Timm, C. 2007. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 66: 31- 34.

Cortez, A., Carvalho A., Ikuno, A., Bürger, K. and Vidal-Martins, A. 2006. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. *Arq. Inst. Biol. São Paulo*. 73(2): 157-163.

Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Coelho, A. C., Matos, M., Vinue, L., Rodrigues, J. e Torres, C. 2007. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance

genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. Veterinary Microbiology.

Costa, D., Poeta, P., Saenz, Y., Vinue, L., Coelho, A. C., Matos, M., Rojo-Bezares, B., Rodrigues, J. and Torres, C. 2008. Mechanisms of antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from wild animals. Microbial Drug Resistance. 14: 71-77.

Daboussi, M. 1997. Fungal transposable elements and genome evolution. Genetica. 100:253-260.

D'Aoust, J. 1991. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. International Journal of food Microbiology. 13: 207-216.

D'Aoust, J., Sewell, A. and Warburton, D. 1992. A comparison of a standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella*. International Journal of Food Microbiology. 16: 41-50.

D'Aoust, J. 1994. *Salmonella* and international food trade. International Journal of Food Microbiology. 24: 11-31.

D'Aoust, J. 1997. *Salmonella* species. 8: 129-158. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers Edited by Doyle, M., Beachat, L. and Monteville, T. ASM Press. Washington D.C.

D'Aoust, J. 1999. *Salmonella*. In: M. P. Doyle (Ed): Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Decker, New York.

D'Aoust, J. 2000. *Salmonella*. 45(2):1233-1279. In: The Microbiological Safety and Quality of Food. Edited by Lund, M., Baird-Parker, T. and Gould, G. An Aspen Publication. Gaithersburg, Maryland.

Davies, J. and Smith, D. 1978. Plasmid-determined resistance to antimicrobial agents. Ann Rev Microbiol. 32: 469-518.

Davies, R., McLaren, I. and Bedford, S. 1999. Observations on the distributions of *Salmonella* in a pig abattoir. Veterinary Record. 1145: 655-661.

Davies, R., Paiba, G., Evans, S. and Dalziel, R. 2000. Surveys for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain. Veterinary Record. 147: 695.

Davies, R., Dalziel, R., Wilesmith, J., Ryan, J., Evans, S., Paiba, G., Byrne, C. and Pascoe, S. 2001. National survey for *Salmonella* in pigs at slaughter in Great Britain. Proceedings of the 4th Int. Symp. on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany. 162-173.

Dazi, M., Mutti, P. Barbuti, S., Quintavalla, S., Manganeli, E., Ghisi, M. and Scaramuzza, N. 2001. Determination of *Salmonella* in meat products: Evaluation of the “BAX™ for screening Salmonella” system. Pubblicazione della SSICA di Parma. 76(3): 259-267.

DeGroot, R. 1991. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae*. Ph. D. thesis, Erasmus University, Holanda. Pp.:20-28.

Delicato, E., Mickcha, J., Fernandes, S. and Pelayo, J. 2004. Resistance profile to antimicrobials of *Salmonella* spp. isolated from human infections. Braz Arch Biol Technol. 47(2): 193-197.

De Medici, D., Pezzotti, G., Marfoggia, D., Caciolo, D., Foschi, G. and Orefice, L. 1998. Comparison between ICS-VIDAS, MSRV and standard cultural method for *Salmonella* recovery in poultry meat. International Journal of food Microbiology. 45: 205-210.

Deschamps, F., Langin, T., Maurer, P., Gerlinger, C., Felenbok, B. and Daboussi, M. 1999. Specific expression of the *Fusarium* transposon Fot1 and effects on target gene transcription. Molecular Microbiology. 31:1373-1383.

Eriksson, J., Lofstrom, C., Aspán, A., Gunnarsson, A., Karlsson, I., Borch, E., Jong, B. and Rasstrom, P. 2005. Comparison of genotyping methods by application to *Salmonella* livingstone strains associated with an outbreak of human salmonellosis. International Journal of Food Microbiology. 104: 93-103.

Errecalde, J. 2004. Uso de antimicrobianos en animals de consumo. Incidência del desarrollo de resistências en Salud Pública. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Fang, Q., Brockmann, S.; Botzenhart, K. and Wiedenmann, A. 2001. Improved detection of *Salmonella* spp. in foods by fluorescent *in situ* hybridization with 23S rRNA probs: a comparison with conventional culture methods. Journal of Food Protection. 66 (5): 723-731.

Farrington, L., Harvey, R., Buckley, S., Droleskey, R., Nisbet, D. and Inskip, P. 2001. Prevalence of antimicrobial resistance in salmonellae isolated from market-age swine. Journal Food Protection. 64 (10): 1496-1502.

Fedorka-Cray, P., Miller, M., Tollefson, L. and Dargatz, D. 1998. Development of Resistance in Salmonella Isolates of Veterinary Origin. Sutton, NE: American Association of Swine Practitioners, pp.173-176.

- Feng, P.** 2001. Rapid methods for detecting foodborne pathogens. 14Pp. Appendix 1. In Bacteriological Analytical Manual Online. (<http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam>).
- Ferber, D.** 2003. Antibiotic resistance. WHO advises kicking the livestock antibiotic habit. Science New York. 301: 1027.
- Fernandes, S., Ghilardi, A., Tavechio, A., Machado, A. and Pignatari, A.** 2003. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med trop S Paulo. 45(2): 59-63.
- Fernández I.** 2006. Detección y caracterización de β -lactamasas en aislamientos de *Salmonella entérica* de origen animal y humano. Universidade de La Rioja.
- Fitts, R.** 1985. Development of a DNA-DNA hybridisation test for the presence of *Salmonella* in foods. Food Technology. March 1985: 95-102.
- Fluit, A. and Schmitz, F.** 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. European Journal Clinical Microbiolgy Infectious Diseases. 18: 761-770.
- Fluit, A. and Schmitz, F.** 2004. Resistance integrons and super-integrons. Clinical Microbiology and Infection. 10: 272-288.
- Gauton, R.** 1997. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. Journal of Clinical Microbiology. 35(11): 2977-2980.
- Giard, J., Laplace, J., Rincé, A., Pichereau, V., Benachour, A., Leboeul C., Fiahaut, S., Auffray, Y. and Hartke, A.** 2001. The stress proteome of *Enterococcus faecalis*. Electrophoresis. 22: 2947–2954.
- Giovannacci, I., Queguiner, S., Ragimbeau, C., Salvat, G., Vendevre, J., Carlier, V. and Ermel, G.** 2001. Tracing of *Salmonella* spp. in two porks slaughter and cutting plants using serotyping and macrorestriction genotyping. Journal of Applied Microbiology. 90: 131-147.
- Goodman, L. and Gilman, A.** 1996. Goodman & Gilman the pharmacological basis of therapeutics, 9. New York: Macgraw- Hill.
- Groody, E.** 1991. Rapid detection foodborne pathogens using DNA probs: 275-282, In: Morgan, M., Smith, C. and Williams, P. (Ed.). Food Safety and Quality Assurance. Application of Immunoassay systems. Elsevier Applied Science.
- Hakanen, A., Kotilainen, P., Jalava, J., Siitonen, A. and Houvinen, A.** 1999. Detection of decreased fluoroquinolone in *Salmonellas* and validation of nalidixic acid screening test. J. Clin. Microbiol. 37: 3572-3577.

Hald, T. 2001. *Salmonella* in pork. Epidemiology, control and the public health impact. Ph. D. Thesis. 310 Pp. Royal Veterinary and Agricultural University. Copenhagen. Denmark.

Hancock, R. and Woodruff, W. 1988. Role of porin and b-lactamase in b-lactam resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis. 10: 770-781.

Haren, L., Ton-Hoang, B. and Chandler, M. 1999. Integrating DNA: transposases and retroviral integrases. Annual Review of Microbiology. 53: 245-281.

Hartman, P. 1997. The evolution of food microbiology. Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. 1: 3-12. Edited by Doyle, M., Beuchat, L. and Monteville, T. ASM Press. Washington D.C.

Heijden, H. 1995. The development and application of LPS-ELISAS to detect *Salmonella* infections in swine. Proceedings of the Symposium on the diagnosis of Salmonella infections. Reno, 31 October: 88-95.

Hill, W. and Jinneman, K. 2000. Principles and applications of genetic technics for detection, identification and subtyping of food associated pathogenic microorganisms. 64 (2): 1813-1838. In The Microbiological Safety and Quality of Food Edited by Barbara M., Baird-Parker, T. and Gould, G. An Aspen Publication. Gaithersburg, Maryland.

Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S., Woodgate, R. and Waldor, M. 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 45: 2991-3000.

Hogue, A., White, P. And Heminover, J. 1998. Pathogens reduction and hazard analysis and critical control point (HACCP) systems for meat and poultry. Veterinary Clinical of North America. Food Animal Practice. 14(1): 151-163.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. and Williams, S. 1994. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. 5: 175-290. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition. Edited by Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. and Williams, S. Wilkins. Baltimore.

Hook, L., Odelson, D., Bogardt, A., Hemmingsen, B., Labeda, D. and MacDonell, M. 1991. Numerical analysis of restriction fragment length polymorphisms and wholecell protein banding patterns: a means of bacterial identification at the species and subspecies level. USFCC Newslett. 21: 1-10.

- Hua-Van, A., Daviere, J., Kaper, F., Langin, T. and Baboussi, M.** 2000. Genome organization in *Fusarium oxysporum*: clusters of class II transposons. *Currents Genetics*. 37:339-347.
- Hughes, K.** 1991. Animal production and human health. 10: 195-232, in *World Animal Science A6. Microbiology of animals and animal products*. Edited by J. B. Woolcock. Elsevier. Amsterdam.
- Hughes, V. and Datta, N.** 1983. Conjugative plasmids in bacteria of the preantibiotic era. *Nature*. 302: 725-726.
- Jacoby, G. and Archer, G.** 1991. New mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *The New England Journal of Medicine*. 324: 601-612.
- Jay, J.** 2000. *Modern Food Microbiology*. Aspen Publishers Inc. Maryland. 6: 511-525.
- Jensen, A., Sorensen, G., Baggesen, D., Bodker, R. and Hoorfar, J.** 2003. Addition of Novobiocin in pré-enrichment step can improve *Salmonella* culture protocol of modified semisolid Rappaport-Vassiliadis. *Journal of Microbiology Methods*. 55: 249-255.
- Jordano, R.** 2002. Doenças de origem microbianas transmitidas pelos alimentos. II Seminário Internacional de Segurança Alimentar. Porto 18 e 19 de Janeiro de 2002.
- Kim, S. and Aga, D.** 2007. Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 10: 559-573.
- Koseoglu, O.** 2004. Integrons. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 38: 305-312.
- Kummerer, K.** 2003. Significance of antibiotics in the environment . *J. Antimicrobial Chemotherapy*. 52: 5-7.
- Kummerer, K.** 2004. Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* . 54:311-320.
- Landgraf, M. and Franco, B.** 1996. Doenças microbianas de origem alimentar provocadas por enteropatógenos. *Revista de Ciências Farmacêuticas*. São Paulo. 17(1): 57-76.
- Langin, T., Capy, C. and Daboussi, M.** 1995. The transposable element *impala*, a fungal member of the *Tc1-mariner* superfamily. *Molecular and General Genetics*. 246:19-28.

- Lévesque, C. and Roy, P.** 1993. PCR analysis of integrons. Cap. 7.4. Ed.: Persing, D., Smith, T., Tenover, F. and White, T. Diagnostic molecular microbiology. American Society for Microbiology. Washington D.C.
- Lewin B.** 1996. Transposons. Genes VI. Oxford University Press, USA. Pp. 563-598.
- Lewin, B.** 2001. Genes VII. Oxford Univ. Press.
- Li, X., Mehrotra, M., Ghimire, S. and Adewoye, L.** 2007. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. Veterinary Microbiology. 121: 197-214.
- Lipsitch, M., Bergstrom, C. and Levin, B.** 2000. The epidemiology of antibiotic resistance in hospitals: paradoxes and prescriptions. Proc. Natl. Acad.Sci. USA. 97:1938-1943.
- Livermore, D.** 1995. B-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical Microbiology Reviews. 8: 557-584.
- Luna, C., Gherardi, C., Famiglietti, A. and Vay, C.** 2001. Bacterial resistance and antimicrobial therapy in respiratory medicine and intensive care. Medicina (B Aires). 61:603-13.
- Lupski, J.** 1987. Molecular mechanisms for transposition of drug resistance genes and other movable genetic elements. Rev Infect. 9: 357-368.
- Machado, J., Vieira, R. and Ternudo, P.** 1999. Vigilância Epidemiológica Laboratorial de Enterobacteriáceas. Informações 1. Impresso nas Oficinas Gráficas da Direcção Geral de Veterinária.
- Madsen, L., Aarestrup, F. and Olsen, J.** 2000. Characterisation of streptomycin resistance determinants in Danish isolates of *Salmonella typhimurium*. Veterinary Microbiology. 75: 73-82.
- Madigan, M., Martinko, J. and Parker, J.** 1996. Microbial genetics. in Biology of microorganisms. Prentice-Hall. USA. 8: 304-356.
- Madigan, M., Martinko, J. and Parcker, J.** 2000. Brock Biology of Microorganisms. Tenth edn: Prentice Hall INC.
- Marín, M. and Gudiol, F.** 2003. Antibióticos betalactámicos. Enferm Infecc Microbiol Clin. 21(1): 42-55.
- Martinez, A. and Collins, M.** 1991. *Enterococcus sulfureus*, a new yellow-pigmented *Enterococcus* species. FEMS Microbiol Lett. 80: 69-74.
- Masters, P., O'Bryan, T., Zurlo, J., Miller, D. and Joshi, N.** 2003. Trimethoprim-sulfamethoxazole revisited. Archives of Internal Medicine. 163: 402-410.

Matos, M. 2001. Marcadores moleculares. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

Mayrhofer, S., Paulsen, P., Smulders, F. and Hilbert, F. 2004. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int J Food Microbiol.* 97: 23-29.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V. and Davies, J. 2000. Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel aad gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 44: 1568-1574.

Mazel, D. 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature reviews.* 4: 608-620.

McDonough, P., Jacobson, R. and Timoney, J. 1989. Virulence determinants of *Salmonella Typhimurium* from animal sources. *American Journal of Veterinary Research.* 50(5): 662-670.

McGowan, J. 1987. Is antimicrobial resistance in hospital microorganisms related to antibiotic use? *Bull NY Acad Med.* 63: 253-268

McKane, L. And Kandel, J. 1996. Diseases acquired through the alimentary tract. *Microbiology.* 22: 564-601.

Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L., Bresee, J., Shapiro, C., Griffin, P. and Tauxe, R. 1999. Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerging Infections Diseases.* 5:607-625.

Merquior, V., Stern, C. and Teixeira L. 1991. Caracterização de amostras de *Enterococcus faecalis* por análise do perfil de proteínas totais e imunoblot. Abstracts of the XVI Congresso Brasileiro de Microbiologia. 22: 239.

Merquior, V., Peralta, J., Facklam, R. and Teixeira, L. 1994. Analysis of Electrophoretic Whole-Cell Protein Profiles as a Tool for Characterization of *Enterococcus* Species. *Current Microbiology.* 28: 149-153.

Millemann, Y., Lesage-Descauses, M., Chalus-Dancla, E. and Lafont, J. 1995. Value of Plasmid profiling, ribotyping and detection of IS 200 for tracing avian isolates of *Salmonella Typhimurium* and *Salmonella Enteritidis*. *Journal of Clinical Microbiology.* 33(1): 173-179.

Miranda, A., Singh, K. and Murray, B. 1991. DNA fingerprinting of *Enterococcus faecium* by pulsed-field gel electrophoresis may be a useful epidemiologic tool. *J Clin Microbiol.* 29: 2752-2757.

Molbak, K., Baggesen, D., Aarestrup, F., Ebbesen, J., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A. and Wegener, H. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *N. Engl. J. Med.* 341:1420-1425.

Mukesh, D. e Mukesh, G. 2002. Serotypic and antibiotic susceptibility pattern of *Salmonella* species isolated from cases of gastroenteritis at Infectious Disease Hospital (IDH), Delhi from 1997-2000. *J. Comm. Dis.* 34:237-244.

Murray, M. 1986. *Salmonella: Virulence factors and enteric salmonellosis.* *Journal of American Veterinary Medical Association.* 189(2): 145-147.

Neva, F. and Brown, H. 1994. *Basic Clinical Parasitology.* 6^a Edition. Prentice-Hall International Editions.

Nield, B., Holmes, A., Gillings, M., Recchia, G., Mabbutt, B., Nevalainen, K. and Stokes, H. 2001. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiology Letters.* 195: 59-65.

Nijsten, R., London, N., Bogaard, A. and Stobberingh, V. 1993. Antibiotic resistance of enterobacteriaceae isolated from the faecal flora of fattening pigs. 15(4): 152-157.

Nikaido H. 1988. Bacterial resistance to antibiotics as a function of outer membrane permeability. *J Antimicrob Chemother.* 22: 17-22.

Nikaido, H. and Vaara M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Micribiol Rev.* 49: 1-32.;

Notermans, S. and Hoogenboom-Verdegaal, A. 1992. Existing and emerging foodborne diseases. *International Journal of food Microbiology.* 15: 197-205.

Novais, M. 2002. *Toxinfeccões Alimentares. Dados do INSA 1992/2000.* Livro de Resumos do Food Protection 2002. Monte da Caparica, 22 de Fevereiro de 2002: 15-17.

Novais, M. 2003. *Toxinfeccões Alimentares. Livro de resumos da I Conferência Nacional da Segurança Alimentar.* Lisboa, 11 e 12 de Dezembro: 1-7.

Oliveira, M., Andrade, G., Guerra, M. and Bernardo, F. 2003. Development of a Fluorescent *in situ* hybridization protocol for the rapid detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias.* 98 (547): 119-124.

Oliveira, S., Flores, F., Santos, L. and Brandelli, A. 2005 Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. Int J Food Microbiol. 97(3): 297-305.

Olsen, J. 1999. Antibiotic resistance: genetic mechanisms and mobility. Acta Veterinaria Scandinavica. 92: 15-22.

Olsen, S., Bishop, R., Brenner, F., Roels, T., Bean, N., Tauxe, R. e Slutsker, L. 2001. The Changing Epidemiology of *Salmonella*: Trends in Serotypes Isolates from Human in the States, 1987-1997. J. Infect. Dis. 183:753-761.

Peirano, G. 2005. Caracterização molecular da resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp e *Shizella* spp multirresistentes. Ensino IOC. BP-D-164

Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Jones, C., Person, R. and Waddell, J. 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 53:28-52.

Piddoch, L. 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy? Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 38:1-3.

Pitout, J., Thomson, K., Hanson, N., Ehrhardt, A., Moland, E. and Sanders, C. 1998. β -Lactamases responsible for resistance to expanded-spectrum cephalosporins in *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* isolates recovered in South Africa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 42: 1350-1354.

Ploy, M., Lambert, T., Couty, J. and Denis, F. 2000. Integrons: an antibiotic resistance gene capture and expression system. Clinical Chemistry Laboratory Medicine. 38: 483-487.

Poeta, P. 2006. Resistência a antibióticos, factores de virulência e bacteriocinas em estirpes comensais de *Enterococcus* spp. de animais e humanos. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Poeta, P., Igrejas, G. and Rodrigues, J. 2007. Detecção molecular e microbiológica de resistência aos antibióticos. Serie Didáctica. Ciências Aplicadas. 316: 9-39.

Popoff, M. 2001. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. Report of the WHO Collaborating Center for reference and Research on *Salmonella*. 8th edition. Institute Pasteur. Paris.

Poppe C., Martin L., Gyles C., Reid-Smith R., Boerlin P., McEwen S., Prescott J. and Forward K. 2005. Acquisition of resistance to extended-spectrum cephalosporins by *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* serovar Newport and *Escherichia coli* in the Turkey poult intestinal tract. *Environm Microbiology*. 71: 1184-1192.

Porwollik, S., Boyd, E., Choy, C., Cheng, P., Florea, L., Proctor, E. and McClelland, M. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I serovars by use of microarrays. *Journal of Bacteriology*. 186(17): 5883-5898.

Radcliffe, D. and Holbrook, R. 2000. Detection of microorganisms in food. Principles and application of immunological techniques. 63(2): 1791-1812. *Microbiological Safety and Quality of Food*. Edited by Lund, B., Baird-Parker, T. and Gould, G. An Aspen Publication. Gaithersburg, Maryland.

Ranucci, D., Miraglia, D., Branciarri, R., D'ovidio, V. and Severini, M. 2004. Microbiology characteristics of hamburgers and raw pork sausages, and antibiotic-resistance of isolated bacteria. *Veterinary Research Communications*. 28: 269-272.

Recchia, G. and Hall, R. 1995. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology (Reading, England)*. 141(12): 3015-3027.

Reynolds, P. 1984. Resistance of the antibiotic target site. *Brit Med Bull*. 40: 3-10.

Rezende, C., Mesquita, A., Andrade, M. Linhares, G., Mesquita, A. and Minafra, C. 2005. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no Estado de Goiás, Brasil, e perfil de resistência a antimicrobianos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*. 100: 199-203.

Riaño, I., Moreno, M., Teshager, T., Sáenz, Y., Domínguez, L. and Torres, C. 2006. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 58: 844-847.

Ribot, E., Wierzba, R., Angulo, F. and Barret, T. 2002. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 1004 isolates from humans, United States, 1985, 1990 and 1995. *Emerging Infectious Diseases*. 8: 387-391.

Riley, M. and Wertz, J. 2002. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annu. Rev. Microbiol*. 56:117-137.

Roe, M., Vega, E. and Pillai, S. 2003. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. *Emerg Infect Dis.* 9(7): 822-826.

Rojas, J. 2004. Bacteriocinas: una estrategia de competencia microbiana propuesta como alternativa de antibióticos dirigidos para el futuro humano; Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sabaté, M. and Prats, G. 2002. Estructura y función de los integrones. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 20(7): 341-345.

Sáenz, Y., Brinas, L., Dominguez, E., Ruiz, J., Zarazaga, M., Vila, J. and Torres, C., 2004. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 48: 3996-4001.

Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230: 1350-1354.

Santos, D., Berchieri, A., Fernandes, S., Tavechio, A. and Amaral, L. 2000. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 20(1).

Schluter, A., Szczepanowski, R. and Puhler, A. 2007. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. *FEMS Microbiol Rev.* 31: 449-477.

Sefton, A. 2002. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millennium. *Drugs.* 62: 557-566.

Seo, K., Brackett, R., Hartman, N. and Campbell, D. 1999. Development of a rapid response biosensor for detection of *Salmonella* Typhimurium. *Journal of Food Protection.* 62(5): 431-437.

Sockett, P. and Tood, E. 2002. The economic cost of foodborne disease. *Microbiology Safety and Quality of Food.* 56(2): 1563-1598.

Sousa, J. 2000. *Enterobacteriaceae.* 8(2): 99-109. *Microbiologia.* Editado por Ferreira, W. and Sousa, J. Lidel, Edições Técnicas, Lda. Lisboa.

Sousa, J., Peixe, L., Ferreira, H., Pinto, M., Nascimento, M., Sousa, M. and Cabral, M. 1999. *Microbiologia.* 1(12): 240-269.

Sorensen, O., Mcfall, M., Rawluck, S., Ollis, G., Schoonderwoerd, M. and Manninem, K. 2001. *Salmonella enterica* in Alberta Slaughter hohs. Proceedings of the 4th Int. Symp. on the Epidemiology and Control of *Salmonella* and other food borne pathogens in Pork. Leipzig, Germany. 183-185.

Steward, C., Rasheed, J., Hubert, S., Biddle, J., Raney, P. et al. 2001. Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended-spectrum β -lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 2864-2872.

Stokes, H. and Hall, R. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol*. 3:1669- 1683.

Swanenburg, M. 2000. *Salmonella* in the pork production chain: Sources of *Salmonella* on pork. PhD Thesis, 161Pp. Netherlands.

Tamarin, R. 1999. Principios de genética. Editorial Reverté, S.A. pp.: 345-247.

Taveira, N. 2000. Detecção e identificação Molecular de Microrganismos. In *Microbiologia* 1(2): 3-37. Editado por Ferreira, W. and Sousa, J. Lidel, Edições Técnicas, Lda. Lisboa.

Tietjen, M. and Fung, D. 1995. *Salmonellae* and Food Safety. *Critical Reviews in Microbiology*. 21(1): 53-83.

Tipper, J. 1985. Mode of action of β -lactam antibiotics. *Pharmacology & Therapeutics*. 27: 1-35.

Tirolli, I. e Costa, C. 2006. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus. *Acta Amazónica*. 36(2): 205-208.

Tokumar, M., Konuma, H., Umesako, M., Konno, S. and Shinagawa, K. 1990. Rates of detection of *Salmonella* and *Campylobacter* in meats in response to the sample size and the infection level of each species. *International Journal of Food Microbiology*. 13: 41-46.

Torres, C. and Zarazaga, E. 2002. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. *Vamos por el buen camino? Gaceta Sanitaria*. 16:109-112.

Turnidge, J. 2004 Antibiotic use in animals-prejudices, perceptions and realities. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 53: 26-27.

- Van Belkum, A., Struelens, M., Visser, A., Verbrugh, H. and Tibayrenc, M.** 2001. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics and microbial epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(3): 547-560.
- Varma, J., Greene, K., Ovitt, J., Barrett, T., Medalla, F., Angulo, F.** 2005. Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984-2002. *Emerging Infections Diseases*. 11 (6): 943-946.
- Versalovic, J. Woods, C., Georghiou, P., Hamil, R. and Lupski, J.** 1993. DNA-based identification and epidemiologic typing of bacterial pathogens. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 117: 1088-1098.
- Vieira-Pinto, M.** 2006. Ocorrência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos para consumo. Tese de Doutorado. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.
- Videira, A.** 2001. Engenharia Genética – Princípios e Aplicações. Lidel. Lisboa, pp167.
- Walsh, C.** 2003. Antibiotics that block DNA replication and repair: the quinolonas. In: Walsh C. (Editor). *Antibiotics. Actions, origins, resistance*. American Society for Microbiology. Washington DC. Pp.: 71-77.
- Wegener, H., Baggesen, D. e Gaarslev, K.** 1994. *Salmonella* Typhimurium phage types from human salmonellosis in Denmark 1998 to 1993. *APMIS*. 102: 521-525.
- White, P., McIver, C. and Rawlinson, W.** 2001. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2658-2661.
- Wiedmann, M.** 2004. Molecular detection and subtyping methods for foodborne pathogens. *Proceedings of the Congress Food Protection*. Monte da Caparica. Portugal. Pp.: 57-61.
- Wilcock, B. and Schwartz, K.** 1992. *Salmonellosis. Diseases of swine*. 46: 570-583. 7th ed. Edited by Leman, A., Straw, B. and Mengeling, W. Iowa State University Press. Ames, Iowa.
- Witte, W.** 1998. Medical consequences of antibiotics use in agriculture. *Science*. 279: 996-997.
- Wyatt, G., Langley, M., Lee, H. and Morgan, M.** 1991. *Salmonella* Immunoassay or Immunoenrichment – a chicken and egg situation: 267-273, In: Morgan, M., Smith, C. and Williams, P. (Ed.). *Food Safety and Quality Assurance. Application of Immunoassay systems*. Elsevier Applied Science.

Yan, S., Pendrak, M., Abela-Ridder, B., Punderson, V., Fedorko, D. and Foley, S. 2003. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. Clin Appl Immunol Rev. 4: 189-204.

Anexo 1 – Composição dos meios utilizados para o isolamento de *Salmonella* sp.

➤ Água peptonada (BPW – Buffered Peptone Water)

Composição:

- Digestão enzimática da caseína ----- 10 g
- Cloreto de sódio ----- 5 g
- Na₂HPO₄ . 12 H₂O ----- 9 g
- KH₂PO₄ ----- 1,5 g
- Água ----- 1000 ml

Procedimento:

- Dissolver os componentes em água (se necessário, através de calor);
- Ajustar o pH (7,0 ± 0,2 a 25°C);
- Esterilizar na autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

➤ Meio Semi-sólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV)

Composição:

- Triptose ----- 4,59 g/l
- Hidrolisado de caseína ----- 4,59 g/l
- Cloreto de sódio ----- 7,34 g/l
- Dihidrogeno-fosfato de potássio ----- 1,47 g/l
- Cloreto de magnésio anidro ----- 10,93 g/l
- Verde de malaquita ----- 0,037 g/l
- Agár ----- 2,7 g/l

Procedimento:

- Para 500 ml de água destilada, pesar 15,8 gramas de meio;
- Colocar em banho de água a ferver até o meio de cultura de se dissolver completamente.

➤ Xilose Lysine Desoxycholate (XLD)

Composição:

- Extracto de levedura em pó ----- 3 g
- Cloreto de sódio ----- 5 g
- Xilose ----- 3,75 g
- Lactose ----- 7,5 g
- Sacarose ----- 7,5 g
- Hidrocloridrato de L-lysina ----- 5 g
- Tiosulfato de sódio ----- 6,8 g
- Citrato de amónio e ferro (III) ----- 0,8 g
- Vermelho de fenol ----- 0,08 g
- Desoxicolato de sódio ----- 1,0 g
- Agár ----- de 9 a 18 g
- Água ----- 1000 ml

Procedimento:

- Dissolver o pó em água através de aquecimento, com agitação frequente, até o meio começar a ferver. Evitar o sobreaquecimento;
- Colocar em banho-maria até à distribuição do meio pelas placas.

➤ Hektoen

Composição:

- Peptone ----- 15 g/l
- Cloreto de sódio ----- 5 g/l
- Extracto de levedura ----- 3 g/l
- Sacarose ----- 14 g/l
- Lactose ----- 14 g/l
- Salicina ----- 2 g/l
- Tiosulfato sódico ----- 5 g/l
- Citrato de amónio e ferro (III) --- 1,5 g/l
- Mistura de sais biliares ----- 2 g/l
- Azul de bromotimol ----- 0,05 g/l
- Fucsina ácida ----- 0,08 g/l
- Agár ----- 13,5 g/l

Procedimento:

- Para 1 litro de água destilada pesar 75 gramas de meio;
- Deixar repousar durante 10 minutos;
- Dissolver, aquecendo o meio em banho maria de água a ferver.

➤ Solução de novobiocina

Composição:

- Sal sódico de Novobiocina----- 0,04 g
- Água ----- 5 ml

Procedimento:

- Dissolver em água e esterilizar por filtração;
- O armazenamento pode ser de 4 semanas a $3^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Anexo 2 – Composição das provas bioquímicas

➤ Lisina

Composição:

- Mono-Hydrocloridrato de L-lysina ----- 5 g
- Extracto de levedura ----- 3 g
- Glucose ----- 1 g
- Vermelho de bromocresol----- 0,015 g
- Água ----- 1000 ml

Procedimento:

- Colocar 5 ml de água destilada em cada um dos tubos;
- Colocar uma pastilha de lisina em cada um dos tubos;
- Levar a esterilizar na autoclave a 121°C durante 15 minutos;
- Identificar os tubos

➤ -Indol

Procedimento:

- Para 1 litro de água destilada dissolver 1,35 g do meio em pó;
- Dissolver sem utilizar a acção do calor;
- Distribuir 3 ml por cada tubo esterilizado;
- Identificar os tubos

➤ Ureia (culmited 413822)

Composição:

- Ureia-----20,0 g/l
- Extrato de levedura----- 0,1 g/l
- Dihidrogénio fosfato de potássio-- 9,1 g/l
- Vermelho de fenol-----0,01 g/l
- Dihidrogénio fosfato de sódio ----- 9,1 g/l

Procedimento:

- Para 1 litro de água destilada dissolver 38,7 g do meio em pó;
- Distribuir 3 ml em tubos de tampa de rosca e esterilizados;

- Esterilizar por calor húmido no autoclave durante 15 minutos a 121°C;
- Identificar os tubos

➤ TSI (Triple Sugar Iron) (Oxoid CM277)

Composição:

- Bacto extracto de carne de boi----- 3,0 g/l
- Bacto extracto de levedira----- 3,0 g/l
- Bacto peptona-----15,0 g/l
- Proteose peptona----- 5,0 g/l
- Bacto dextrose ----- 1,0 g/l
- Bacto dextrose ----- 1,0 g/l
- Bacto lactose -----10,0 g/l
- Sulfato de ferro ----- 0,2 g/l
- NaCl----- 5,0 g/l
- Tiosulfato de sódio----- 0,3 g/l
- Vermelho de fenol----- 0,024 g/l
- Agar -----12,0 g/l

Procedimento:

- Para 1 litro de água destilada dissolver 65 g do meio em pó;
- Distribuir 3 ml em tubos de tampa de rosca e esterilizados;
- Esterilizar por calor húmido no autoclave durante 15 minutos a 121°C;
- Identificar os tubos

Anexo 3 – Composição dos meios para testar a resistência a antibióticos

➤ Meio de BHI (Brain Heart Infusion) (Oxoid CM 225)

Composição:

- Cérebro de boi ----- 200 g/l
- Carne e coração----- 250 g/l
- Peptona proteose----- 10 g/l
- Bacto-dextrose ----- 2,0 g/l
- Cloreto de sódio ----- 5,0 g/l
- Fosfato de sódio ----- 2,5 g/l

Procedimento:

- Para 1 litro de água destilada dissolver 37,0g de BHI;
- Distribuir 3 ml em tubos de tampa de rosca e esterilizados;
- Esterilizar por calor húmido no autoclave durante 15 minutos a 121°C;
- Identificar os tubos

➤ Brain Hert Infusion (BHI) agar (Difco)

Composição:

- Cérebro de boi ----- 200 g/l
- Carne e coração----- 250 g/l
- Peptona proteose----- 10 g/l
- Bacto-dextrose ----- 2,0 g/l
- Cloreto de sódio ----- 5,0 g/l
- Fosfato de sódio ----- 2,5 g/l

Procedimento:

- Para 1 litro de água destilada dissolver 52,0 g do meio;
- Esterilizar por calor húmido no autoclave durante 15 minutos a 121°C;
- Distribuir o meio em placas de Petri esterilizadas na câmara de fluxo laminar;
- Identificar as placas.

➤ Soro fisiológico

Composição:

- NaCl ----- 7,0 g/l
- Água destilada -----1000ml

Procedimento:

- Para 1 litro de água destilada dissolver 7 g de NaCl;
- Distribuir 3 ml em tubos de tampa de rosca e esterilizados;
- Esterilizar por calor húmido no autoclave durante 15 minutos a 121°C;
- Identificar os tubos.

➤ Agar Mueller- Hinton difco, (Oxoid CM 337)

Composição:

- Infusão de carne desidratada---- 300,0 g/l
- Hidrolizado de caseína-----17,5 g/l
- Amido ----- 1,5 g/l
- Agar -----17,0 g/l

Procedimento:

- Para 1 litro de água destilada dissolver 38,0 g de Mueller-Hinton;
- Aquecer em banho-maria até entrar em ebulição durante um minuto;
- Esterilizar no autoclave durante 15 minutos a 121°C;
- Distribuir o meio em placas de Petri esterilizadas na câmara de fluxo laminar;
- Identificar as placas.

➤ Meio de leite desidratado (Difro) – Utilizado para guardar as estirpes congeladas.

Procedimento:

- Para 100 ml de água destilada, pesar 10 g de pó;
- Aquecer no microondas;
- Distribuir pelos tubos (2 ml em cada);
- Colocar as tampas sem fechar completamente;
- Autoclavar durante 10 minutos a 121°C;
- Fechar os tubos.

Anexo 4 – Tabelas de resultados relativo ao teste de sensibilidade e resistência ao antibióticos.

Tabela 1 – Tabela de resultados para os isolados de javali relativo ao teste de resistência a antibióticos (23 isolados).

Antibióticos		AMC	CAZ	CTX	AZT	FOX	AMP	IMP	CIP	GEN	TET	AK	TOB	STR	NAL	SXT	CHL
Origem	Colónia																
J 4	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
J 4	3	I	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	I	S	S	R
J 10	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S
J 12	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
J 15	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
J 15	3	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
J 27	1	I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
J 27	3	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R
J 30	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
J 30	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
J 32	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
J 33	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	S	R
J 33	3	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R
J 41	1	I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
J 42	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
J 44	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I	I	R	S
J 45	1	S	S	S	S	S	R	S	S	I	R	S	S	S	S	R	S
J 47	3	I	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	R	R
J 53	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	S	R
J 57	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	S	R
J 58	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	I	S	S	R
J 58	3	I	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	S	R
J 61	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R

Tabela 2 – Tabela de resultados para os isolados de porco bísaro relativo ao teste de resistência a antibióticos (36 isolados).

Antibióticos Origem	Colónia	AMC	CAZ	CTX	AZT	FOX	AMP	IMP	CIP	GEN	TET	AK	TOB	STR	NAL	SXT	CHL
B1	1	S	S	S	S	S	R	S	S	I	R	S	S	I	R	R	S
B1	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	R	R	S
B2	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
B3	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I	R	R	S
B4	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I	S	R	S
B4	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
B5	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
B6	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
B7	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B8	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B9	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B10	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B11	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B12	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
B14	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
B16	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	I	R	S	S	R
B17	2	I	I	I	S	S	R	S	S	I	R	S	I	R	S	R	R
B18	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
B19	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B19	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R
B20	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R
B21	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B22	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
B23	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B24	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B25	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I	S	R	S
B26	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S

(Continuação)

Antibióticos		AMC	CAZ	CTX	AZT	FOX	AMP	IMP	CIP	GEN	TET	AK	TOB	STR	NAL	SXT	CHL
Origem	Colónia																
B27	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B27	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B28	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
B29	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
B29	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S
B30	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
B30	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
B31	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I	S	R	S
B34	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S

Tabela 3 – Tabela de resultados para os isolados de avestruz relativo ao teste de resistência a antibióticos (5 isolados).

Antibióticos		AMC	CAZ	CTX	AZT	FOX	AMP	IMP	CIP	GEN	TET	AK	TOB	STR	NAL	SXT	CHL
Origem	Colónia																
AVT 1	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	R
AVT 1	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
AVT 7	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
AVT 14	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	R	S
AVT 14	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	R	S

Tabela 4 – Tabela de resultados para os isolados de coelho selvagem relativo ao teste de resistência a antibióticos (40 isolados).

Antibióticos		AMC	CAZ	CTX	AZT	FOX	AMP	IMP	CIP	GEN	TET	AK	TOB	STR	NAL	SXT	CHL
Origem	Colônia																
C2	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
C3	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
C5	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
C6	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C8	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
C10	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
C11	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C12	1	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C13	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C15	1	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	S
C16	1	I	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S	R
C17	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C20	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
C21	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C22	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
C22	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
C31	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	I	R	R	S
C32	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	R
C34	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C35	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
C36	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
C37	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C38	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C39	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C40	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	S	R

(Continuação)

Antibióticos		AMC	CAZ	CTX	AZT	FOX	AMP	IMP	CIP	GEN	TET	AK	TOB	STR	NAL	SXT	CHL
Origem	Colónia																
C41	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	R
C41	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C43	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
C45	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C47	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C49	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C51	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C53	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C54	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
C56	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C62	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
C64	1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
C65	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C69	2	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S
C71	1	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R