



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rossiane de Moura Souza

**Resistência antimicrobiana, genes e propriedades de virulência, em
cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis isoladas de fontes
animais, alimentos e de doença humana no Brasil**

Rio de Janeiro

2015

Rossiane de Moura Souza

Resistência antimicrobiana, genes e propriedades de virulência em cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis isoladas de fontes animais, alimentos e de doença humana no Brasil

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade

Rio de Janeiro

2015

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S731 Souza, Rossiane de Moura.
Resistência antimicrobiana, genes e propriedades de virulência em cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis isoladas de fontes animais, alimento e de doença humana no Brasil / Rossiane de Moura Souza – 2015. 140f.

Orientador: João Ramos Costa Andrade.
Coorientadora: Dália dos Prazeres Rodrigues.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. *Salmonella enteritidis* – Teses. 2. Resistência microbiana a medicamentos – Teses. 3. Biofilme – Teses. 4. Expressão gênica – Teses. I. Andrade, João Ramos Costa. II. Rodrigues, Dália dos Prazeres. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.851.49

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rossiane de Moura Souza

Resistência antimicrobiana, genes e propriedades de virulência em cepas de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis isoladas de fontes animais, alimento e de doença humana no Brasil

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de setembro de 2015.

Coorientadora: Dália dos Prazeres Rodrigues
Fundação Oswaldo Cruz

Banca Examinadora:

Prof. Dr. João Ramos Costa Andrade (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dra. Mara Lúcia Penna Queiroz
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dra. Alice Gonçalves Martins Gonzalez
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Aloysio de Mello Figueiredo Cerqueira
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

À minha mãe e meu pai, Adelir e Jonas (*in memoriam*), que sempre foram exemplos do bem proceder, sendo o apoio e estímulo da minha vida pessoal e profissional.
Ao meu filho Lucas, pela compreensão, apoio, estímulo e amizade.

AGRADECIMENTOS

A Deus que permitiu o planejamento, execução e finalização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. João Andrade pela cuidadosa orientação, pela polidez e gentileza diante de minhas dificuldades.

À Dra. Dália Rodrigues pelas cepas de *Salmonella* Enteritidis cedidas e pelas idéias sugeridas.

À Profa. Dra. Mara Queiroz da disciplina de Microbiologia e Imunologia da UERJ, pelo auxílio com as atividades relacionadas à resistência aos antimicrobianos.

À minha amiga Elizabeth Guimarães, pelo estímulo, apoio e amizade.

Ao meu irmão Sérgio, pelo carinho e amizade.

À Thays Araújo do Laboratório 1, da disciplina de Microbiologia e Imunologia da UERJ, pelo auxílio nas atividades laboratoriais, apoio e amizade.

À Raquel Rebello do Laboratório 1, da disciplina de Microbiologia e Imunologia da UERJ, pelo auxílio nas atividades laboratoriais, apoio e amizade.

À Dra. Máira Liberal do Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro, da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro pelo apoio, estímulo, e auxílio na aquisição de insumos e reagentes.

À Técnica da UERJ Emanuela Araújo da disciplina de Microbiologia e Imunologia da UERJ, pelo auxílio nas atividades laboratoriais.

A todos os colegas do Laboratório 1 da disciplina de Microbiologia e Imunologia da UERJ, pelo companheirismo.

À Dra. Eliane Falavina do IOC/FIOCRUZ pelo apoio e auxílio laboratorial.

À Viviane da Silva Cruz do Laboratório de Enterobactérias do IOC/FIOCRUZ pelo auxílio com o banco de dados das cepas de *Salmonella* Enteritidis.

À Eladir Charelli, do Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro, da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro pelo apoio laboratorial.

Aos colegas do Laboratório de Enterobactérias do IOC/FIOCRUZ que colaboraram direta ou indiretamente com este trabalho.

A todos os colegas do Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro, da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, que colaboraram direta ou indiretamente com este trabalho.

À Diretoria da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro pelo apoio e compreensão.

À Coordenação, professores e secretaria do Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pelo auxílio, solicitude e compreensão.

Um cientista, que também é um ser humano, não
deve descansar enquanto o conhecimento que pode
reduzir o sofrimento repousa em uma estante.

Albert Sabin

RESUMO

SOUZA, Rossiane de Moura. *Resistência antimicrobiana, genes e propriedades de virulência em cepas de Salmonella enterica sorotipo Enteritidis isoladas de fontes animais, alimento e de doença humana no Brasil*. 2015. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Salmonella Enteritidis é uma das principais causas de doenças veiculadas por alimentos em todo o mundo. Muitos genes cromossômicos e plasmidiais são requeridos para a virulência, e a invasão das células epiteliais do intestino é essencial para o sucesso da infecção. Considerando os poucos estudos realizados no Brasil, investigou-se a ocorrência de genes de virulência, a produção de biofilme, adesinas e celulose, a expressão de flagelos e a capacidade de invasão celular de *S. Enteritidis* e sua correlação com as condições de cultivo planctônica e em biofilme, avaliando ainda a expressão diferencial de genes envolvidos na invasão celular. As cepas foram isoladas entre 2006 e 2010 de diferentes regiões geográficas do Brasil de seres humanos, alimentos e animais. A presença de 14 genes de virulência foi testada por PCR, a invasão de células epiteliais humanas (Caco-2 e HEp-2) foi avaliada por ensaio quantitativo, a resistência antimicrobiana foi avaliada por testes de susceptibilidade padronizados, a produção de biofilme foi investigada por teste quantitativo e diferenças na capacidade de associação e invasão celular foram comparadas após cultivo planctônico e em biofilme, sendo a expressão diferencial de genes envolvidos na invasão examinada por RT-qPCR. De 163 cepas de *S. Enteritidis* (humanos, 55; alimentos, 75; animais, 33) 98% possuíam todos os genes de virulência testados (*invE/A*, *orgA*, *hilA*, *sipA*, *sseA*, *ssrB*, *mgtC*, *siiE*, *sopB*, *sefA*, *slyA*, *phoP/Q*, *stn* e *spvC*). De 85 cepas, apenas 2,3% mostrou susceptibilidade a todos os antimicrobianos testados e 71% eram resistentes à quinolona. No geral, 13% foram multi-resistentes a drogas (MDR para ≥ 3 classes de antimicrobianos). Em dois casos de doença humana identificou-se nas cepas o gene ESBL *bla*_{CTX-M-2}. De 40 cepas (seres humanos, 25; aves, 8; alimentos derivados de aves, 7) 87,5% invadiram enterócitos humanos (Caco-2). De 72 cepas, 92% eram forte ou moderadamente produtoras de biofilme, ocorrendo marcante co-expressão de curli e celulose em 83% das cepas fortemente produtoras. Cepas em cultivo planctônico foram mais eficientes na invasão a enterócitos em relação às em cultivo em biofilme, assim como a expressão dos genes *sipA*, *invA* e *hilA* situados na ilha SPI-1, associada a invasão celular, mostrou-se reduzida em *S. enterica* provenientes de biofilme. A maioria das cepas estudadas além de carrear uma ampla gama de genes cromossômicos e o megaplasmídeo de virulência, foi capaz de aderir e invadir eficientemente enterócitos humanos, sugerindo um potencial patogênico para as cepas que circulam no reservatório animal e em alimentos desta origem. Verificou-se também uma alta frequência de cepas MDR, especialmente entre os isolados de seres humanos. Detectaram-se taxas significativas de resistência às quinolonas (71%) e a fluoroquinolonas (7%), em adição à resistência às cefalosporinas (6%) e aos aminoglicosídeos (2%). Identificaram-se pela primeira vez no Brasil, duas cepas produtoras de ESBL CTX-M-2, isoladas de casos de doença humana. Foi verificada marcante capacidade de produção de biofilme pela maioria das cepas. Observou-se ainda redução da capacidade de invasão celular após cultivo em biofilme e foi caracterizado que tal defeito resulta da regulação diferencial de genes encontrados na ilha SPI-1.

Palavras-chave: Genes de virulência. Susceptibilidade a antimicrobianos. MDR. ESBL.

Invasão celular. Biofilme. Expressão gênica. RT-qPCR.

ABSTRACT

SOUZA, Rossiane de Moura. *Antimicrobial resistance, genes and virulence properties of Salmonella enterica serotype Enteritidis strains isolated from animal sources, food and human disease in Brazil*. 2015. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Salmonella Enteritidis is a major cause of foodborne illnesses worldwide. Birds are the main reservoir and poultry-derived foods are important sources of human infection. Many chromosomal and plasmid genes are required for virulence, and invasion of the intestinal epithelial cells is an essential step for the success of the infection. Considering that few studies on *S. Enteritidis* virulence were conducted in Brazil, we investigated the occurrence of virulence genes, production of biofilm, adhesins and cellulose, flagella expression and cell invasiveness of *S. Enteritidis* and its correlation with planktonic and biofilm growing conditions, still evaluating the differential expression of genes involved in cell invasion. All strains were isolated between 2006 and 2010 in different regions of Brazil from humans, food and animals. The presence of 14 virulence genes was tested by PCR, the invasion of human epithelial cells (Caco-2 and HEp-2) was evaluated by a quantitative test, the antimicrobial resistance was assessed by standard susceptibility tests, the production of biofilm was investigated by a quantitative test and differences in cell-association ability and cellular invasion were compared after planktonic- and biofilm-growing conditions, with the differential expression of genes involved in invasion examined by RT-qPCR. From 163 *S. Enteritidis* strains (human, 55; food, 75; animals, 33) 98% have all tested positive for 14 virulence genes (*invE/A*, *orgA*, *hilA*, *sipA*, *sseA*, *ssrB*, *mgtC*, *siiE*, *sopB*, *sefA*, *slyA*, *phoP/Q*, *stn* and *spvC*). From 85 strains, only 2.3% showed susceptibility to all antimicrobials tested and 71% were resistant to quinolone. Overall, 13% were multi-drug resistant (MDR for ≥ 3 classes of antimicrobials). Two strains isolated from cases of human gastroenteritis carried the ESBL gene *bla*_{CTX-M-2}. From 40 strains (human, 25; birds, 8; poultry-derived food, 7) 87.5% invaded human enterocytes (Caco-2). From 72 strains, 92% were strong or moderately biofilm-producers, occurring coexpression of curli pili and cellulose in 83% of the strong biofilm-producing strains. Strains growing in planktonic condition were more efficient in enterocyte invasion than strains growing in biofilms, and the expression of *sipA*, *invA* and *hilA* genes, located in the SPI-1 island (associated with cell invasion) was reduced in micro-organisms recovered from the biofilm. Most of the strains studied, besides of carrying a wide range of chromosomal genes and the virulence megaplasmid, is capable of adhering and efficiently invade human enterocytes, suggesting a pathogenic potential for the strains that circulate in the animal reservoir and animal foods. There was also a high frequency of MDR strains, especially among human isolates. We detected significant rates of resistance to quinolones (71%) and fluoroquinolones (7%) in addition to the resistance to cephalosporins (6%) and the aminoglycosides (2%). It was identified for the first time in Brazil, two CTX-M-2 ESBL-producing strains isolated from two epidemiologically unrelated cases of human disease. Striking biofilm production capability was found for most of the strains tested. We also observed reduced cell invasiveness after bacterial growth in biofilms and characterized that such defect results from differential regulation of genes found in the SPI-1 island.

Keywords: Virulence genes. Antimicrobial susceptibility. MDR. ESBL. Cell invasion. Biofilm. Gene expression. RT-qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1 -	Inserção na membrana bacteriana e na membrana da célula hospedeira do Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3).....	26
Quadro 1 -	Cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas no ano 2006.....	38
Quadro 2 -	Cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas no ano 2007.....	39
Quadro 3 -	Cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas no ano 2008.....	40
Quadro 4 -	Cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas no ano de 2009.....	41
Quadro 5 -	Cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas no ano de 2010.....	42
Quadro 6 -	Iniciadores (“primers”) utilizados para identificação dos genes bacterianos investigados.....	48
Quadro 7 -	Iniciadores (“primers”) utilizados para identificação de genes relacionados à ESBL investigados.....	50
Quadro 8 -	Cepas de <i>S. Enteritidis</i> de origem aviária (AL e AN) selecionadas para o estudo das características fenotípicas associadas à virulência.....	52
Quadro 9 -	Cepas de <i>S. Enteritidis</i> de origem humana selecionadas para o estudo das características fenotípicas associadas à virulência.....	53
Quadro 10 -	Iniciadores (“primers”) utilizados na RT-qPCR.....	67
Figura 1 -	PCR para distinção entre <i>Salmonella</i> spp. e <i>S. Enteritidis</i> utilizando a pesquisa da sequência randômica cromossômica (429bp) e do gene <i>sefA</i> (312bp), respectivamente.....	69
Figura 2 -	Deteção por PCR do gene <i>orgA</i> em cepas de <i>S. Enteritidis</i>	70
Figura 3 -	Deteção fenotípica das <i>S. Enteritidis</i> produtoras de ESBL.....	71

Figura 4 -	Detecção da presença de curli, em meio com vermelho congo e da produção de celulose, em meio com calcoflúor.....	79
Figura 5 -	Atividade invasora de <i>S. Enteritidis</i> para células Caco-2 após cultivo em condição planctônica e em biofilme, revelada por imunofluorescência.....	87
Figura 6 -	Mobilização da actina celular por <i>S. Enteritidis</i> cultivada em condição planctônica e em biofilme.....	88
Figura 7 -	Expressão de curli por cepas de <i>S. Enteritidis</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características das cepas de <i>S. Enteritidis</i> avaliadas neste estudo.....	44
Tabela 2 -	Principais características de 72 cepas selecionadas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas no período 2006-2010.....	54
Tabela 3 -	Perfil de resistência aos antimicrobianos nas cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas entre 2006 e 2010.....	72
Tabela 4 -	Fenótipos de <i>S. Enteritidis</i> com resistência múltipla identificados neste estudo.....	73
Tabela 5 -	Produção de biofilme, presença de adesinas e expressão de celulose e flagelos em 72 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas de humanos e de aves no período 2006-2010.....	75
Tabela 6 -	Associação entre expressão de curli e celulose e produção de biofilme por 72 cepas de <i>S. Enteritidis</i>	77
Tabela 7 -	Associação e invasão de <i>S. Enteritidis</i> a células Caco-2 polarizadas e diferenciadas, após 3 h de infecção.....	81/82
Tabela 8 -	Principais características de um subconjunto de <i>S. Enteritidis</i> fortemente produtoras de biofilme.....	83
Tabela 9 -	Interação de cepas de um subconjunto de <i>S. Enteritidis</i> fortemente produtoras de biofilme cultivadas em condição planctônica ou em biofilme com células Caco-2 polarizadas e diferenciadas após 1 hora de infecção.....	86
Tabela 10 -	Interação de variantes de <i>S. Enteritidis</i> , que expressam ou não curli com células Caco-2 polarizadas e diferenciadas após 1 hora de infecção.....	91
Tabela 11 -	Expressão de genes da ilha SPI-1 em cepas de <i>Salmonella</i> spp. em cultivo planctônico e biofilme.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AL	<i>Cepas de S. Enteritidis</i> isoladas de alimentos
AN	<i>Cepas de S. Enteritidis</i> isoladas de animais
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BapA	<i>Biofilm-associated protein</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention - EUA</i>
cDNA	DNA complementar
CFA	<i>Colonization Factor Antigen Agar</i>
CV	<i>Ágar Costa Vernin</i>
D-MEM	Dulbecco (formulação) do <i>Eagle's Minimal Essential Medium</i>
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos fosfatados
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ESBL	<i>Extended Spectrum Beta-Lactamase</i>
FCM/UERJ	Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
HU	<i>Cepas de S. Enteritidis</i> isoladas de doença humana
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LB	<i>Luria Bertani</i>
LBNS	<i>Luria Bertani No Salt</i>
LIA	<i>Lysine Iron Agar</i>
LPF	<i>Long Polar Fimbriae</i>
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	<i>Multidrug-Resistant</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEF	<i>Plasmid Encoded Fimbriae</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
pSLT	<i>Plasmídeo de Salmonella enterica</i>

PT	<i>Phage Type</i>
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	Reverse Transcription-qPCR
SCV	<i>Salmonella-containing vacuole</i>
SISLAB	Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública
SFB	<i>Serum Fetal Bovine</i> "
SPI	Salmonella Pathogenicity Island
spv	Salmonella Virulence Plasmid
SST3	Sistema de Secreção do Tipo 3
SCV	<i>Salmonella-Contain Vacuole</i>
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
UV	Radiação ultra-violeta
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
<	Menor que
β	Beta
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
rpm	Rotações por minuto
α	Alfa
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
pb	Pares de bases

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	36
1.1	Geral	36
1.2	Específicos	36
2	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.1	Cepas bacterianas	37
2.1.1	<u>Cepas bacterianas e critérios de seleção</u>	37
2.1.2	<u>Identificação convencional das cepas de <i>S. Enteritidis</i></u>	45
2.2	Reação em Cadeia da Polimerase - PCR	46
2.2.1	<u>Extração do DNA</u>	46
2.2.2	<u>Amplificação do DNA bacteriano</u>	46
2.2.3	<u>Detecção do produto da amplificação</u>	47
2.3	Teste de susceptibilidade antimicrobiana	49
2.4	Detecção fenotípica de cepas produtoras de ESBL	49
2.5	Amplificação de genes de ESBL por PCR	50
2.6	Características fenotípicas associadas à virulência em cepas humanas e aviárias	51
2.6.1	<u>Seleção das cepas</u>	51
2.6.2	<u>Produção de biofilme</u>	55
2.6.3	<u>Quantificação do biofilme produzido</u>	55
2.6.4	<u>Pesquisa do gene <i>bap</i></u>	56
2.6.5	<u>Expressão de Curli</u>	56
2.6.6	<u>Verificação da produção de Celulose</u>	57
2.6.7	<u>Verificação da expressão de Pili (fímbria) tipo 1</u>	57
2.6.7.1	Estimulação da expressão de Pili tipo 1.....	58
2.6.7.2	Teste de aglutinação de levedura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) em lâmina de vidro.....	58
2.6.8	<u>Expressão de flagelo e motilidade das cepas bacterianas</u>	59
2.6.9	<u>Atividade invasora para enterócitos humanos (linhagem celular Caco-2)</u>	59
2.6.9.1	Cultivo e preparo dos inóculos bacterianos.....	59

2.6.9.2	Cultivo e manutenção da linhagem Caco-2.....	59
2.6.9.3	Preparo dos tapetes celulares para o teste de invasão.....	60
2.6.9.4	Teste quantitativo de invasão.....	60
2.6.9.5	Determinação dos índices de invasão e associação.....	60
2.7	Investigação da capacidade de associação e invasão de cepas fortemente produtoras de biofilme em cultivo planctônico bactérias planctônico (bactérias planctônicas) e em biofilme (bactérias sésseis).....	61
2.7.1	<u>Condições de cultivo das cepas bacterianas.....</u>	61
2.7.2	<u>Teste quantitativo de invasão.....</u>	62
2.8	Observação da invasão bacteriana por microscopia de fase/fluorescência.....	62
2.8.1	<u>Demonstração da localização intracelular ou extracelular das bactérias por microscopia de fluorescência (dupla marcação).....</u>	62
2.8.2	<u>Observação microscópica da mobilização de actina por <i>Salmonella enterica</i>.....</u>	63
2.8.3	<u>Montagem e observação das lamínulas.....</u>	64
2.9	Microscopia eletrônica de transmissão.....	64
2.10	RT-qPCR para verificação da expressão de genes da ilha SPI-1 em cepas cultivadas em condição planctônica e em biofilme.....	65
2.10.1	<u>Extração de RNA e síntese de cDNA.....</u>	65
2.10.2	<u>Execução da PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR).....</u>	66
2.11	Estatística.....	68
3	RESULTADOS	69
4	DISCUSSÃO	93
	CONCLUSÕES.....	100
	REFERÊNCIAS.....	102
	APÊNDICE - Formato final do 1 ^o artigo científico submetido: Virulence genes, enterocyte invasion and antimicrobial resistance of <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis isolated in Brazil from 2006 through 2010.....	112
	ANEXO - Comprovação de submissão do 1 ^o artigo científico.....	140

INTRODUÇÃO

A *Salmonella* spp. é uma das principais causas de infecção transmitida por alimentos tanto nos países desenvolvidos quanto nos emergentes. Aparentemente a cadeia de produção de alimentos colabora fortemente para a estimativa de que patógenos de natureza zoonótica são três vezes mais associados a infecções emergentes do que àqueles de natureza não zoonótica. (FORSHELL e WIERUP, 2006).

O grau de adaptação ao hospedeiro varia entre os sorotipos de *Salmonella* spp. e afeta a patogenicidade para homens e animais. Sorotipos altamente adaptados ao homem, como a *Salmonella enterica* sorotipo Typhi e sorotipo Paratyphi, geralmente causam doenças severas em humanos tais como a síndrome septicêmica tifóide (febre entérica ou tifóide ou paratifóide). Esses sorotipos normalmente não são patogênicos para os animais (COWDEN *et al.*, 1989).

Sorotipos que são altamente adaptados aos animais, tais como a *S. enterica* sorotipos Gallinarum e Pullorum (aves), ou *S. enterica* sorotipo Abortus-ovis (carneiro), geralmente produzem sintomas leves em humanos. Entretanto, *S. enterica* sorotipo Cholerasuis, que tem como hospedeiro primário os suínos, pode causar uma severa doença sistêmica no homem. Da mesma forma, *S. enterica* sorotipo Dublin, que tem preferência por bovinos, é responsável por uma salmonelose sistêmica em humanos. Nos bovinos esse sorotipo provoca alta mortalidade em bezerros e em bovinos adultos leva a febre, redução na produção de leite, diarreia, aborto, e ocasionalmente morte (VELGE *et al.*, 2005).

Sorotipos ubiqüitários, como *S. enterica* sorotipos Enteritidis (*S. Enteritidis*) e Typhimurium (*S. Typhimurium*), os quais afetam tanto o homem quanto os animais, geralmente causam infecção gastrointestinal, estando frequentemente associados à doenças veiculadas por alimentos. Entretanto, também tem a capacidade de produzir infecções semelhantes à febre tifóide no homem ou a colonização intestinal assintomática em animais (COWDEN *et al.*, 1989, VELGE *et al.*, 2012).

Salmonella spp. são bactérias Gram negativas, predominantemente patogênicas, da família *Enterobacteriaceae* que presumivelmente, divergiram de um ancestral comum com a *Escherichia coli*, há cerca de 100 milhões de anos. Embora ainda ocorram discussões quanto à nomenclatura, a adotada mundialmente pelos microbiologistas com base nos métodos moleculares é o gênero *Salmonella* com 2

espécies (LE MINOR e POPOFF, 1987; EUZÉBY, 1999; BRENER *et al.*, 2000). Esta nomenclatura está de acordo com a taxonomia atualmente aceita. As duas espécies no gênero *Salmonella* são *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a *S. enterica* possui cerca de 2600 sorovares ou sorotipos (TINDALL *et al.*, 2005, GRIMONT, WEILL, 2007; VELGE *et al.*, 2012).

A *S. enterica*, está dividida em 6 subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica*. Na *S. enterica* subespécie *enterica* os sorotipos ou sorovares são indicados por nomes e estes devem ser escritos com a primeira letra em caixa alta e sem itálico, ex: *S. enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (GRIMONT e WEILL, 2007; GUIBOURDENCHE, M., *et al.*, 2010). Entretanto, em geral, adota-se *S. Enteritidis* para resumir a extensa nomenclatura.

Antes da taxonomia para *Salmonella* ser estabelecida com base na genética molecular, as subespécies de *S. enterica* foram consideradas como subgêneros e os sorotipos foram tratados como espécies. Foram assim estabelecidos os seguintes subgêneros: **I** (*S. enterica* subsp. *enterica*), **II** (*S. enterica* subsp. *salamae*), **III** (anteriormente designado gênero *Arizona* subdividido em **IIIa** - *S. enterica* subsp. *arizonae*, e **IIIb** - *S. enterica* subsp. *diarizonae*), **IV** (*S. enterica* subsp. *houtenae*), **V** (*S. bongori*), e **VI** (*S. enterica* subsp. *indica*) (GUIBOURDENCHE, M., *et al.*, 2010). Esta designação numérica ainda é utilizada por alguns autores, referindo-se as atuais espécies e subespécies.

Ao longo do tempo, os sorotipos ou sorovares de *Salmonella* spp. receberam nomes de acordo com os sintomas (ex: *S. Typhi*), de acordo com os sintomas e o hospedeiro (ex: *S. Abortus-Ovis*, *S. Abortus-Equi*) e em outros casos foram erradamente nomeadas considerando o sintoma e a espécie hospedeira específica (*S. Typhi-Murium*, *S. Cholerae-Suis*). Em seguida, passou-se a nomear os sorovares de acordo com a origem geográfica, tal como *S. London*, *S. Panamá*. No entanto, em outras bactérias tal como a *E. coli*, não existem nomes e sim a designação da fórmula antigênica. Em *Salmonella* os nomes dos sorovares foram mantidos apenas na subespécie *enterica* a qual inclui mais de 99,5% das cepas isoladas (GRIMONT e WEILL, 2007).

Comparações pareadas entre os genomas sequenciados de *Salmonella* spp. indicam que, apesar apresentarem entre 97,6% e 99,5% de identidade entre os genes

housekeeping, cerca de 10% dos genes são únicos para cada sorotipo (PARKHILL *et al.*, 2001; DENG *et al.*, 2003).

A *Salmonella* spp. tem sido reconhecida como causa de doença intestinal por muitos anos, e os métodos de controle estão estabelecidos. Entretanto, a despeito disso, *Salmonella enterica* permanece como a principal causa de doença veiculada por alimentos em todo o mundo e em recentes anos tem aumentado massivamente a sua ocorrência. As salmonelas adaptadas aos humanos e associadas às febres tifoide e paratifoide são raramente transmitidas pelo alimento, quando comparadas com os sorotipos ubiqüitários (LÁZARO, *et al.*, 2008).

Nos EUA, aproximadamente 40.000 casos de salmonelose não tifóide em humanos são relatados anualmente ao CDC (Centers for Disease Control and Prevention). Acredita-se, entretanto, que ocorra um grande número de casos não notificados e, por isso, estima-se que os casos anuais ultrapassem 1 milhão. Na União Européia o número de casos humanos relatados em 1997 foi acima de 100 mil (VELGE *et al.*, 2005).

Na epidemiologia da doença, os sorotipos predominantes são os ubiqüitários, também chamados zoonóticos. Na França, em 2001, mais de 70% dos casos humanos foram causados por *S. enterica* de 3 sorotipos: Enteritidis (33%), Typhimurium (32%), e Hadar (6%). Nos EUA, no mesmo período, destacaram-se quatro sorotipos de *S. enterica*: Typhimurium (22,1%), Enteritidis (17,7%), Newport (10%) e Heidelberg (5,9%) (VELGE *et al.*, 2005).

As duas maiores alterações na epidemiologia da salmonelose não tifóide ocorreram na Europa e nos EUA na segunda metade do século 20: a emergência das doenças humanas de transmissão alimentar, causadas principalmente pela *S. Enteritidis* e por amostras de *S. Typhimurium* multi-resistentes a antibióticos.

Nos EUA, a *S. Enteritidis* aumentou a frequência, saindo dos 6 mais comuns sorotipos em 1963 para tornar-se o mais frequente em 1990, o que acontece até hoje. Embora o número de relatos feitos ao CDC de isolamento do sorotipo Enteritidis tenha declinado em 1999, voltou a aumentar em algumas regiões dos EUA, a partir de 2001. Na Inglaterra foram 200 casos relatados em 1966, 10.000 em 1981, alcançando 33.000 casos em 1997 (mais de 70% dos casos de salmoneloses). Embora tenha ocorrido um declínio na incidência, o sorotipo Enteritidis continua a ser o sorotipo de *Salmonella* mais frequentemente isolado. De forma similar, em vários países da

América do Sul e no Brasil, o sorotipo Enteritidis tornou-se um dos mais importantes envolvidos em doença humana (VELGE *et al.*, 2005).

Os fatores responsáveis para a disseminação epidêmica de *S. Enteritidis* ainda não estão esclarecidos. Um dos fatores que podem ter importância epidemiológica é a dificuldade de detecção do patógeno em animais infectados, especialmente em frangos. A presença de animais portadores, sem sintomas e as dificuldades técnicas para sua detecção antes ou durante a inspeção dos produtos de origem animal, os convertem em fonte contínua de contaminação do meio ambiente e dos alimentos.

Alguns autores sugerem que a *S. Enteritidis* foi introduzida nas criações de frangos pelos roedores, quando usada como raticida. Este micro-organismo foi usado pela primeira vez como controle biológico de roedores durante o surto de *Yersinia pestis* em São Francisco (EUA) no ano de 1895 e continuou sendo utilizada como controle populacional de roedores nos EUA e na Europa, até 1960. Nestes países, existem relatos correlacionando a presença de *Salmonella* spp. em ratos e a contaminação de frangos. Alguns autores demonstraram que várias espécies silvestres, especialmente roedores, mantêm a infecção de *S. Enteritidis* nas granjas ou fazendas de produção (SILVA e DUARTE, 2002; VELGE *et al.*, 2005).

Foi proposto que a redução da ocorrência do sorotipo Gallinarum, devido à vacinação, abriu um nicho ecológico no qual a *S. Enteritidis* pode se estabelecer nas criações de frango (VELGE *et al.*, 2005).

Durante as últimas duas décadas, no Brasil, assim como tem sido descrito em diversos países, *S. Enteritidis* superou *S. Typhimurium* como o sorotipo de *S. enterica* mais frequentemente envolvido em infecções humanas e animais. Além da gastroenterite, a incidência de bacteremias causadas por este sorotipo vem aumentando na doença humana e, atualmente, é mais frequentemente associado com infecções invasivas do que *S. Typhimurium* (TAVECHIO *et al.*, 1996; FUZIHARA *et al.*, 2000; SCUR *et al.*, 2014).

Tavechio *et al.* (1996), observando a ocorrência de sorovares de *S. enterica* no Estado de São Paulo entre os anos de 1991 a 1995, verificaram um aumento significativo no isolamento de *S. Enteritidis* no período. O levantamento foi feito em amostras de fontes humanas e não humanas (alimentos, animais, rações para animais e ambiente). Os autores relataram que de 5490 cepas de *Salmonella* spp. isoladas, a ocorrência de *S. Enteritidis* foi: 1,2% em 1991, 2% em 1992, 10,1% em 1993, 43,3% em 1994, e 64,9% em 1995.

Fuzihara *et al.* (2000) avaliando a prevalência de sorotipos de *Salmonella* spp. em 60 pequenos matadouros de aves no Estado de São Paulo, coletou amostras de carcaças, utensílios e de ambiente, encontrando 17 sorotipos em 41% das amostras pesquisadas, predominando o *S. Enteritidis* (30%), seguido por *S. Albany* (12%), *S. Hadar* (12%), e *S. Indiana* (10%).

Ainda no Estado de São Paulo, Gama *et al.* (2003) monitoraram a presença de *Salmonella* spp. em aves poedeiras, desde o transporte do animal com um dia de idade até a fase de postura (até 76 semanas de idade), avaliando ainda os ovos, em diferentes granjas. Foram isoladas *Salmonella* spp. na caixa de transporte de animais de um dia (33%), nas fezes e em ovos das poedeiras monitoradas desde o primeiro dia de vida (0,2 a 2%). O sorovar isolado foi predominantemente *S. Enteritidis*.

Fernandes *et al.* (2006) analisaram a ocorrência dos sorovares de *S. enterica* causadores de infecções em humanos no Estado de São Paulo, no período de 1996 a 2003, e em um total de 3554 cepas isoladas, 67,4% foram do sorovar *Enteritidis*, seguido pelo sorovar *Typhimurium* (5,2%).

Ribeiro *et al.* (2007) avaliaram a presença de *Salmonella* spp. em cortes de frango (asa, perna, peito e dorso) coletados em uma planta de processamento, na região Sul do Brasil. Das 61 amostras pesquisadas, 39% foram positivas para *Salmonella* spp. O sorovar prevalente foi *S. Enteritidis* (84%), seguido pelo *S. Hadar* (12%) e *S. Typhimurim* (4%).

Duarte *et al.* (2009), em Recife/PE, pesquisaram 260 carcaças de frango e isolaram *Salmonella* spp. em 9,6% das amostras. A maior ocorrência foi de *S. Enteritidis* (25%).

Medeiros *et al.* (2011) analisaram, quanto à presença de *Salmonella* spp., carcaças de frango congeladas, coletadas pelos Departamentos de Vigilância Sanitária Estaduais ou Municipais em 15 municípios de diferentes Estados brasileiros. A prevalência apresentou variações para cada Estado. Em São Paulo 50% das amostras foram positivas, sendo essa ocorrência três vezes maior do que a média nacional. Oito sorotipos foram identificados, no entanto, o mais frequente foi *S. Enteritidis* (48%), seguido pelo *S. Infantis* (7,6%), *S. Typhimurium* (7,2%) e *S. Heidelberg* (6,4%).

Evêncio-Luz *et al.* (2012) estudaram o nível de contaminação de ovos crus e queijo coalho por *Salmonella* spp. nas duas maiores cidades do Nordeste brasileiro, Salvador / BA e Recife /PE. Para tanto, coletaram ovos crus e queijo coalho em nove

pequenos mercados das duas cidades. A prevalência de *Salmonella* spp. em casca de ovos e gemas foi de 11% e 25%, enquanto que, no queijo coalho foi 7,8% e 12% respectivamente para as cidades de Recife e Salvador.

Paschoal Cardoso *et al.* (2013) avaliaram 976 amostras de “swabs” de arrasto de frangos de corte e encontraram como sorovar mais frequente a *S. Enteritidis* (6,3%).

Scur *et al.* (2014) determinaram a ocorrência de vários sorotipos de *Salmonella* spp. em fezes, ração e cama de frango de aves criadas para o corte, no oeste do Paraná entre 2006 e 2010. Das 396 amostras analisadas, 118 foram positivas para *Salmonella* spp. As amostras positivas eram originárias de dois diferentes aviários com capacidade para cerca de 5.000 aves. Foram encontrados 38 sorotipos, e os mais frequentes foram *S. Enteritidis* (16%), *S. Heidelberg* (5,9%), *S. Typhimurium* (5,9%), e *S. Hadar* (5%).

A *Salmonella* spp. tem a cadeia alimentar como principal via de transmissão e a sua presença em animais mostra que este micro-organismo, que é considerado como o mais incidente e relevante agente causal de enfermidade entérica no homem, circula entre animais e seres humanos. Entretanto, exíguo é o conhecimento, particularmente no Brasil, quanto ao potencial de virulência das cepas de *S. Enteritidis* circulantes, especialmente em decorrência da multiplicidade de espécies animais criadas com o objetivo da produção de alimentos e da extensão territorial do país.

No Brasil poucos trabalhos foram realizados sobre genes de virulência em *S. Enteritidis* e entre eles pode-se destacar Castilla (2003), Oliveira *et al.* (2003) e Castilla *et al.* (2006). Castilla (2003) e Castilla *et al.* (2006) avaliaram três genes de virulência (*sefC*, *pefA* e *spvC*) em cepas do fagotipo 4 e ainda a influência desses genes na colonização do ceco e invasão de fígado e baço em aves (pintos) de 1 dia de idade. Os autores encontraram diferentes perfis genéticos para as amostras, que foram classificadas em quatro genótipos. Não detectaram, no entanto, diferenças quanto à colonização e invasão bacteriana nos animais desafiados. Oliveira *et al.* (2003) avaliaram a ocorrência de três genes de virulência em *S. Enteritidis* (*invA*, *spvR* e *spvC*) isoladas de diversas fontes, não encontrando diferença significativa na prevalência desses genes.

Geralmente as infecções por *S. Enteritidis* resultam em uma gastroenterite, mas pode ocorrer a disseminação da bactéria além do trato intestinal, vindo a causar uma infecção sistêmica. A *S. Enteritidis* tem uma ampla gama de hospedeiros, além

do homem, incluindo roedores, aves, bovinos e outros mamíferos. Em geral, a *S. Enteritidis* ingerida em água ou alimentos contaminados, provoca a gastroenterite auto-limitante, mas pode provocar uma doença sistêmica. Para tanto, *S. Enteritidis* após atravessar a mucosa intestinal, infecta macrófagos e se dissemina através do sangue, para o fígado e baço, enquanto se multiplica na célula hospedeira. O nicho típico intracelular da *Salmonella enterica* é o SCV (“*Salmonella*-containing vacuole”), mas o modo de entrada e a estratégia de sobrevivência dentro da célula alvo variam de acordo com o tipo celular e depende da expressão de genes específicos. As células alvo da *Salmonella enterica* incluem células M, enterócitos, macrófagos, neutrófilos, monócitos, células dendríticas, granulócitos, células B e células T (GARAI *et al.*, 2012; RAMOS-MORALES, 2012).

Análises da estrutura genética dos patógenos bacterianos revela que os genes de virulência frequentemente estão localizados em regiões específicas do cromossoma (“clusters”), denominadas ilhas de patogenicidade. Três observações sugerem que os patógenos adquiriram esses “clusters” de genes através da transferência horizontal: (a) as ilhas de patogenicidade frequentemente têm um conteúdo de GC (Guanina-Citosina) que difere significativamente do restante do cromossoma, (b) as ilhas de patogenicidade são flanqueadas por genes que são normalmente encontrados em bactérias não patogênicas, e (c) remanescentes de sequências de bacteriófagos ou de transposon frequentemente estão próximos das bordas das ilhas de patogenicidade, sugerindo um possível mecanismo de aquisição de genes (BESSER *et al.*, 2000).

Salmonella spp. conta com múltiplos fatores de virulência, contidos em ilhas de patogenicidade, denominadas SPI (“*Salmonella* Pathogenicity Island”). Estas são formadas por sequências específicas de DNA bacteriano, que codificam determinantes de virulência responsáveis por interações peculiares com o hospedeiro (MARCUS *et al.*, 2000).

Alguns autores consideram a existência de doze SPI, sendo que algumas são conservadas dentro do gênero *Salmonella*, enquanto outras são específicas de certos sorotipos, tal como SPI-8 para *S. Typhi* ou para certos subgêneros como SPI-6, 9 e 10 para o subgênero I (HENSEL, 2004; VELGE *et al.*, 2005).

Entretanto, cinco ilhas de patogenicidade estão bem caracterizadas em *S. enterica*: SPI-1, necessária para a invasão bacteriana em células não fagocíticas, como aquelas do epitélio da mucosa intestinal; SPI-2, SPI-3 e SPI-4 as quais têm seus

genes primariamente requeridos para o crescimento e sobrevivência da bactéria na fase sistêmica da doença; e por último, SPI-5 que codifica fatores de virulência envolvidos na inflamação e secreção de cloretos, caracterizando a fase entérica da doença. SPI-1 e SPI-2 codificam proteínas estruturalmente e funcionalmente diferentes que cooperam para a montagem de um sistema especializado de secreção de proteínas, o Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3), o qual é responsável pela liberação de moléculas efetoras dentro da célula do hospedeiro. SPI-1 codifica um SST3 que transfere proteínas efetoras para o interior das células do hospedeiro, sendo necessário para a invasão de células não fagocíticas e a enteropatogenicidade, enquanto o SPI-2 codifica o SST3 necessário para a sobrevivência em macrófagos, injetando proteínas efetoras no citossoma da célula e impedindo a ligação dos lisossomas com o vacúolo intracelular (SCV) onde a *Salmonella* se localiza no macrófago (GALAN, 2001; RAMOS-MORALES, 2012).

O SST3 é uma estrutura especializada cuja principal função é transferir proteínas bacterianas para o interior das células eucarióticas (CORNELIS e VAN GIHSEGEM, 2000; GALAN e COLLMER, 1999). Esse sistema tem sua evolução relacionada com o aparato de formação flagelar e está presente em bactérias patogênicas para os animais e plantas, além de bactérias simbióticas em plantas e insetos. Muitas bactérias patogênicas Gram negativas usam o SST3 para secretar proteínas diretamente no interior da célula hospedeira, entre elas cepas dos gêneros *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia* e *Pseudomonas*. As proteínas secretadas, denominadas de efetoras, são transportadas via uma estrutura tubular curta, em forma de agulha. Essa estrutura leva as proteínas efetoras do interior da bactéria até o citoplasma da célula eucariótica, ultrapassando a membrana interna e externa da bactéria e a membrana da célula hospedeira. A estrutura do SST3 é uma complexa nano-máquina com ao menos 20 diferentes subunidades, composta por uma base inserida na membrana interna, periplasma e membrana externa bacteriana, uma estrutura em forma de agulha localizada no espaço extracelular, e uma estrutura similar a um canal que se insere na membrana plasmática da célula hospedeira. É considerado um dos mais complexos sistemas de secreção de proteínas descrito em bactérias. O sistema é altamente regulado, tanto na transcrição quanto na pós-transcrição (GALAN, 2001; RAMOS-MORALES, 2012).

As proteínas efetoras se tornam alvo do SST3 quando apresentam um sinal, que geralmente está localizado na região N-terminal entre os aminoácidos 20 a 30.

Em alguns casos a translocação depende de um sinal localizado em uma segunda região N-terminal da proteína efetora entre os aminoácidos 50 a 100, que ligará com a chaperona do SST3. Acredita-se que as chaperonas reconhecem as proteínas secretadas pelo SST3. Além disso, as chaperonas previnem a degradação precoce das proteínas do SST3 e impõem uma hierarquia na translocação das proteínas efetoras. Estas proteínas efetoras são fatores de virulência que contribuem, às vezes redundantemente, para remodelar as funções da célula do hospedeiro, subverter a imunidade, estabelecer um nicho de sobrevivência, e promover a proliferação do patógeno (RAMOS-MORALES, 2012).

A ativação do SST3 da SPI-1 (SST3-1) se inicia a partir do contato com a célula epitelial intestinal do hospedeiro e as proteínas efetoras são translocadas através da membrana plasmática celular. Alguns desses efetores estão envolvidos na indução de ondulações e dobraduras na membrana da célula eucariótica (“ruffling”) e na invasão bacteriana. As proteínas efetoras translocadas pelo SST3-1 também desencadeiam a produção de citocinas pro-inflamatórias, recrutam leucócitos polimorfonucleares, e induzem a uma aguda inflamação intestinal (**Esquema 1**).

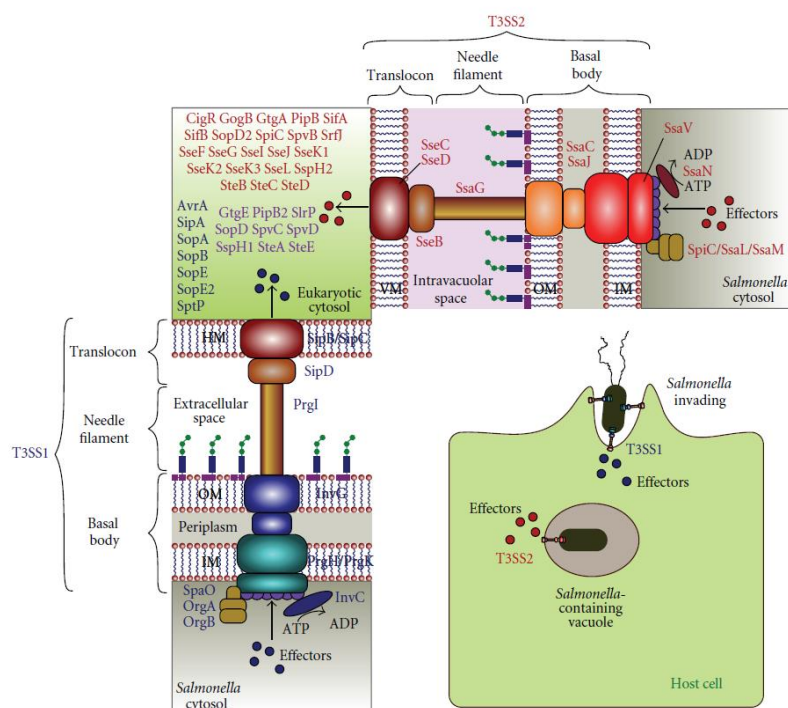
O SST3 da SPI-2 (SST3-2) é encontrado em todas as subespécies da *S. enterica*, mas não foi encontrado em *S. bongori*. Esse SST3 é expresso quando a bactéria encontra-se intracelular, em um ambiente com limitações de nutrientes e pH ácido, estando ainda no interior do SCV. Suas proteínas efetoras são translocadas através da membrana do SCV e irão modular o ambiente intracelular (RAMOS-MORALES, 2012).

A SPI-2 possui ainda genes do sistema regulatório que controla a expressão da ilha (*spiR/ssrB*) e também a secreção das proteínas estruturais que formam o aparato de secreção (SST3), bem como a secreção das proteínas efetoras no citoplasma da célula hospedeira. Atuam ainda sobre a regulação da ilha a proteína SlyA e o sistema regulatório *phoP/phoQ* e *ompR/envZ*. As proteínas efetoras facilitam a sobrevivência e multiplicação da *S. enterica* na célula do hospedeiro, alterando algumas propriedades da célula, tal como a estrutura do citoesqueleto, sinais para vias de transdução, e o tráfego vesicular (FASS e GROISMAN, 2009).

Já SPI-3 é necessária para a sobrevivência dentro de macrófagos e o crescimento em ambientes com baixa concentração de íons magnésio (Mg^{+2}), durante a fase sistêmica da doença. SPI-4 parece ter importante papel na sobrevivência no interior dos macrófagos, e admite-se que possa contribuir na secreção de toxinas.

Semelhante à SPI-1, a SPI-5 parece principalmente associada com a enteropatogenese, estando envolvida na inflamação e na secreção de cloretos (SALYERS e WHITT, 2002; HENSEL, 2004).

Esquema 1 – Inserção na membrana bacteriana e na membrana da célula hospedeira do Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3)



Nota: No esquema observa-se a inserção na membrana bacteriana do Sistema de Secreção do Tipo 3 (SST3), codificado pela SPI-1 (T3SS-1). A sua formação inicia-se intrabacteriana, ultrapassa a membrana bacteriana interna e externa, o espaço extracelular e finalmente a membrana da célula hospedeira, alcançando o citoplasma da célula eucariótica. Com isso é possível à bactéria inocular as proteínas efetoras que promovem a invasão bacteriana. Da mesma forma, o Sistema de Secreção do Tipo 3, codificado pela SPI-2 (T3SS-2) está ancorado na membrana bacteriana interna e externa, saindo do interior da bactéria, ultrapassa o espaço intravacuolar, a membrana do vacúolo e alcança o citoplasma celular liberando nele as proteínas efetoras que impedem a ligação com os lisossomos.

Fonte: Ramos-Morales, 2012.

As ilhas de patogenicidade contêm uma múltipla funcionalidade relacionada aos genes necessários para um específico fenótipo de virulência, sugerindo que a aquisição da ilha de patogenicidade durante a evolução permitiu a abertura a novos nichos de hospedeiros. Por exemplo, a SPI-1 da *Salmonella* possui genes que codificam as proteínas necessárias para a invasão de células intestinais e a indução de secreção intestinal e da resposta inflamatória. Em contraste, os genes da SPI-2

codificam proteínas essenciais para a replicação intracelular, e para o necessário estabelecimento da infecção sistêmica (SALYERS e WHITT, 2002).

Vários são os genes da SPI-1 que atuam na virulência bacteriana gerando um fenótipo adequado para o processo de patogenicidade. A SPI-1 contém um grupo de genes denominados *inv*, que são responsáveis pela formação de “ruffling” (ondulações e dobraduras na membrana da célula eucariótica) relacionadas com a invasão bacteriana. Os genes *inv*, associados com outros genes da SPI-1 (*spa*, *prg* e *org*), codificam para a formação estrutural do SST3. A SPI-1 também carrega genes que codificam proteínas que são injetadas nas células eucarióticas através do SST3, tal como o *sptP* que codifica a enzima tirosina fosfatase, que por sua vez irá provocar alterações nas células da mucosa intestinal levando à diarreia. Outras proteínas injetadas pelo SST3 são SipA e SopE, que estão relacionadas à polimerização da actina do citoesqueleto celular, estando diretamente envolvidas no processo de “ruffling” (KIMBROUGH e MILLER, 2000; RAMOS MORALES, 2012).

A SPI-1 também carrega genes envolvidos na regulação da virulência, tais como: *hilA*, *invF* e *sirA*. Embora seja pouco conhecido o funcionamento da cascata de regulação, estes genes demonstram serem importantes para a fase inicial da infecção, quando a bactéria invade células da mucosa intestinal, mas parecem pouco relevantes em fases posteriores, quando a bactéria se dissemina para o fígado e baço (FÁBREGA, VILA, 2013).

Na SPI-2, o SST3-2 e suas proteínas efetoras manipulam vias endocíticas celulares, levando a maturação do SCV e o seu posicionamento próximo ao complexo de Golgi, onde a replicação é iniciada. Efeitores secretados a partir dos genes da ilha, *sse* e *sif*, tais como SseF, SseG e SifA, têm um papel essencial para o recrutamento de vesículas pós-Golgi. A interação do SCV com o sistema de secreção da célula do hospedeiro pode ser muito importante no favorecimento da replicação da *Salmonella enterica*, em um ambiente pobre em nutrientes como o SCV. Na ilha encontra-se o gene *ssrB*, regulador transcricional central do sistema SsrA/B, requerido para a transcrição dos genes do SST3-2. A proteína SsrB ativaria o promotor de genes efetores e a expressão de operons na ilha SPI-2 e de alguns genes efetores fora daquela ilha, colaborando com a formação, modulação e dinâmica do SCV (PERRETT, ZHOU, 2013).

Na SPI-3, o gene *mgtC*, do operon *mgtCB*, regulado por PhoP/Q, é necessário a sobrevivência da *S. enterica* em macrófagos e crescimento em baixas concentrações de Mg^{+2} , no ambiente do fagossoma (BUCHMEIER *et al.*, 2000).

O gene *siE*, na SPI-4, tem como produto uma adesina para a qual admite-se um papel na fase intestinal da doença em bovinos. A proteína SiiE é secretada por um sistema de secreção tipo 1 (SST1) encontrado na ilha SPI-4 e formado pelos genes *ssiC*, *ssiD* e *ssiF* (KISS *et al.*, 2007).

A SPI-5 possui o gene *sopB*, cujo produto é translocado pelo SST3-1 e sofre regulação do sistema HilA, cujo gene está situado na ilha SPI-1. O gene *sopB* codifica uma inositol fosfatase, aparentemente envolvida na indução de enterite em bovinos (SALYERS e WHITT, 2002; BOHEZ *et al.*, 2008).

Há alguns genes não residentes nas SPI que também parecem compartilhar um papel na doença, como *slyA*, *agfA* e *stn*. O *slyA* é um gene cromossômico, que ativa a expressão do sistema regulador SsrA/B, atuando na expressão do SST3 da ilha SPI-2. O *agfA* codifica para fímbrias finas de agregação e *stn* para uma enterotoxina (PERSING *et al.*, 1993; HACKER *et al.*, 1997; TENOVER *et al.*, 1997; CASTILLA, 2003; PETERS *et al.*, 2003; SOTO *et al.*, 2006; THOMPSON, *et al.*, 2006; HAUTEFORT *et al.*, 2008).

Os genes cromossômicos *phoP/Q*, constituem um sistema regulador negativo da ilha SPI-1. Atua também, positivamente na ativação dos genes da ilha SPI-2. A regulação negativa do SST3-1 decorre do sistema regulador PhoP/Q reprimir a expressão de *hilA* em resposta as baixas concentrações intracelulares de Mg^{+2} nos macrófagos (SALYERS e WHITT, 2002; BOHEZ *et al.*, 2008).

Muitos sorotipos de *Salmonella* abrigam plasmídios de virulência com tamanhos variáveis, dependendo do sorotipo. Todos eles compartilham uma região altamente conservada de 8 Kb, com cinco genes designados *spvRABCD* (*spv* – “*Salmonella* Virulence Plasmid”). A região *spv* parece promover rápida multiplicação e sobrevivência da *Salmonella* dentro das células do hospedeiro, sendo importante para a infecção sistêmica em animais experimentais (SOTO *et al.*, 2006).

Além das ilhas de virulência a *Salmonella enterica* dispõe de outras características que auxiliam na sua sobrevivência, tal como a formação de biofilme que permite uma sobrevivência mais prolongada do micro-organismo no ambiente.

O biofilme é definido como uma comunidade bacteriana organizada que adere a superfícies abióticas e bióticas com uma matriz extracelular de substâncias

poliméricas (polissacarídeos) produzida pela bactéria. A formação de biofilme por agentes patogênicos de origem alimentar tem atraído muita atenção na indústria alimentar, devido aos seus riscos, incluindo a resistência antimicrobiana e produção de fatores de virulência (JONAS *et al.*, 2007; AGARWAL *et al.*, 2011).

As condições ambientais têm um impacto sobre produção de biofilme. A formação de biofilme tem sido descrita na fase estacionária e mostra-se reduzida quando há disponibilidade de nutrientes. Para a produção do biofilme, são necessárias algumas condições, como por exemplo, aerobiose, baixa osmolaridade, e uma baixa temperatura (28°C) de incubação (Fábrega, Vila, 2013).

A formação de biofilme é um processo que se inicia pela ligação de bactérias livres a uma superfície. Em seguida ocorre o desenvolvimento bacteriano ao longo da superfície, com a produção de fina rede de polímeros extracelulares, facilitando a aderência com a superfície e entre as células bacterianas. Essa formação promove uma estrutura tridimensional para o biofilme (DAVEY e O´TOOLE, 2000).

A literatura disponível sugere que a produção de biofilme pode representar uma característica bastante vantajosa para promover a sobrevivência da *Salmonella enterica* fora do hospedeiro. Os autores concordam que a formação de biofilme pode ajudar a sobrevivência em longo prazo, oferecendo mecanismos de resistência a condições extremas encontradas fora do hospedeiro, gerando possibilidade de uma futura nova infecção. No entanto, as características e relações do biofilme com o processo infeccioso ainda não estão bem conhecidas na *Salmonella enterica*, e são necessárias outras pesquisas para fornecer novos conhecimentos sobre a contribuição da formação de biofilme para a patogênese da *Salmonella* spp. (WHITE, A.P., *et al.*, 2008; FÁBREGA, VILA, 2013).

Os elementos que constituem a matriz extracelular são de vários tipos incluindo polissacarídeos, proteínas e às vezes ácidos nucleicos, de acordo com a espécie bacteriana e o ambiente (BRANDA *et al.*, 2005; KOLTER e GREENBERG, 2006).

A *S. enterica* produz um pili, denominado curli, como principal componente proteico da matriz extracelular. Curli são fibras envolvidas na adesão a superfícies, na agregação celular, na persistência no ambiente e na formação do biofilme (BRANHART e CHAPMAN, 2006). Outro componente da matriz extracelular é a celulose, e ambos são regulados por *csgD* (*agfD*), que atua na ativação transcricional do operon *csgBAC*. Outra proteína relacionada ao biofilme é a BapA (“Biofilm – associated protein”), descrita inicialmente em *S. Enteritidis*. A proteína BapA está

relacionada também na formação de película na interface líquido-ar, no meio de cultura. Essa proteína também é regulada pela ação do *csgD* (RÖMLING *et al.* 1998; LATASA *et al.*, 2005; JONAS *et al.*, 2007).

A proteína CsgD é um membro da família LuxR, codificado dentro do operon *csgDEFG*, que tem sido descrito como o principal regulador da produção de biofilme, pois desempenha um papel fundamental na expressão de vários determinantes envolvidos neste processo. CsgD aumenta as fímbrias curli e a expressão da proteína BapA. Atua ainda na pós-transcrição ativando a biossíntese de celulose. Também controla a expressão do tipo morfológico RDAR (“red, dry, and rough”, ou seja, colônia vermelha, seca e rugosa), que é claramente dependente da expressão de fímbrias curli e celulose (Fábrega, Vila, 2013).

Outros fatores podem colaborar com a virulência bacteriana, entre eles destacam-se as fímbrias e adesinas.

S. enterica possui ainda fímbrias e adesinas que colaboram na internalização nas células do hospedeiro, pela ligação bacteriana com a célula alvo. A fímbria ou pili tipo 1 (fim) é codificada pelo operon *fimAICDHF*, é ubiqüitária na família Enterobacteriaceae, é morfológicamente similar, mas antígenicamente distinta da fímbria tipo 1 da *E. coli*. Essas fímbrias são definidas como peritríquias com cerca de 7 nm de largura e 0,2 a 2 µm de comprimento. Fímbrias Tipo 1 se ligam especificamente a receptores com D-manose encontrados em vários tipos de células eucarióticas; por conseguinte, a ligação de bactérias com fímbrias de tipo 1 à células eucarióticas pode ser inibida *in vitro* pela adição de D-manose. A fímbria consiste em uma unidade principal fimA de 21kDa e várias outras proteínas associadas incluindo a adesina fimH. A função da fimH parece ser a mesma na *S. enterica* e na *E. coli*, mas as proteínas não são muito similares. As fímbrias tipo 1 medeiam a adesão da *S. enterica* a algumas células *in vitro*, tal como HeLa, mas parecem não ter um papel importante na associação com outras células como HEp-2 ou MDCK. Em *S. Enteritidis* a fímbria tipo 1 é também denominada SEF 21, sendo codificada pelo gene *fimA* (DIBB-FULLER *et al.*, 1999; VERGEL *et al.*, 2010).

A *S. Enteritidis* conta ainda com a SEF 14, codificada pelo gene *sefA*. Essa fímbria possui diâmetro < 3 nm e é formada por repetidas subunidades de 14,3 kDa, sendo específica das *Salmonella enterica* do grupo D, incluindo *S. Enteritidis* e *S. Dublin* (SOUMET, ERMEL e ROSE, 1999; DIBB-FULLER *et al.*, 1999).

Outras fímbrias tem relevância na virulência da *S. enterica*, tal como a fímbria polar longa (“Long Polar Fimbriae” - LPF). Esta fímbria é codificada no operon *lpfABCDE* e foi identificada inicialmente em *S. Typhimurium*, mas devido a presença de sequências homólogas com *E.coli* flanqueando o operon, sugere-se que tenha sido adquirida pela *Salmonella* spp. por transferência horizontal. A fímbria LPF medeia a adesão bacteriana a placas de Peyer no intestino delgado de ratos. Em experimentos *in vitro* com mutantes *lpfC*, e células intestinais de ratos, a bactéria mostra reduzida capacidade de adesão (VERGEL et al., 2010).

Alguns sorotipos de *Salmonella enterica* tais como Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis e Paratyphi apresentam fímbrias codificadas por plasmídeos que parecem ter relevância na patogênese da infecção. O plasmídeo pSLT de *S. enterica* pode codificar a fímbria PEF (“Plasmid Encoded Fimbriae”) que está relacionada à adesão a células intestinais (FÁBREGA e VILA, 2013).

Algumas proteínas de membrana externa da bactéria parecem exercer influência na virulência bacteriana através da resistência a elementos do processo inflamatório e ainda a facilitação na adesão celular, tal como a proteína Rck, que também é codificada no *spv*, e que parece estar vinculada a um processo de invasão do tipo “zíper”, que não está associado ao SST3 (VERGEL et al., 2010).

O flagelo bacteriano é um apêndice filamentososo sobre a superfície da célula relacionado à motilidade bacteriana. O filamento flagelar é composto por mais de 20.000 subunidades de flagelina. A flagelina é um monômero que em muitas espécies bacterianas, tal como *S. enterica*, tem a sua função associada à virulência e patogenicidade, podendo ser detectada pela célula hospedeira através dos receptores localizados na superfície da célula. A flagelina pode ser detectada por dois diferentes receptores celulares Ipaf e Biracle (ou Naip5). O receptor Ipaf está relacionado ao processo inflamatório, transmitindo sinais pró-inflamatórios em resposta a ativação pela flagelina, o que resulta na ativação da interleucina 1, levando ao desencadeamento da morte celular (piroptose). A sinalização do Naip5 em resposta a flagelina restringe o crescimento bacteriano intracelular antagonizando a habilidade da bactéria de evitar a fusão com lisossomos e a sua capacidade de replicar nos fagossomos (SUN, ROLAN e TSOLIS, 2007).

O tratamento com antimicrobianos apropriados é essencial para a salmonelose, devido à patogênese rápida, e os sintomas debilitantes. Além disso, as infecções com tais espécies de *Salmonella* spp. resistentes a drogas são associadas ao aumento da

morbidade e mortalidade (LE HELLO *et al.*, 2011). Entretanto, a partir de 1970 começaram a aparecer isolados com resistência a alguns antimicrobianos. Estirpes de *S. Typhi* isoladas em surtos no Chile, México, Coreia e Indonésia apresentaram resistência a uma ou duas classes de antimicrobianos. A partir de 1989, surtos causados por *S. Typhi* resistentes a três, quatro ou cinco classes de antimicrobianos começaram a ocorrer em várias partes do mundo. Essas cepas foram então chamadas de MDR (“Multidrug-Resistant”) (ROWE, WARD, THRELFALL, 1997).

Nos últimos anos, ocorreu o crescimento na proporção de isolados de *S. enterica* resistente a vários agentes, em diversos países especialmente na Europa e Estados Unidos. No Reino Unido, houve o aumento marcante na incidência de uma estirpe multirresistente de *S. Typhimurium*, caracterizada como tipo 104 (DT104), que é resistente a cinco agentes (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas, e tetraciclina) o que tem provocado preocupação (GLYNN *et al.*, 2011).

Mais recentemente, devido a maior resistência a antimicrobianos apresentada pela *S. enterica* e o desenvolvimento de fluoroquinolonas, tais como a ciprofloxacina e cefalosporinas de espectro estendido, estas drogas tornaram-se as de escolha para o tratamento das salmoneloses. Considera-se que a disseminação da resistência antimicrobiana entre as *S. enterica* não-tifóide isoladas em humanos é predominantemente devido à utilização de antimicrobianos nos alimentos para os animais. (GEBREYER, ALTIER, 2002; LE HELLO S, *et al.*, 2011).

Entre os principais mecanismos de resistência às fluoroquinolonas nos micro-organismos gram negativos estão as mutações nos genes DNA-girase (*gyrA* e *gyrB*) e na topoisomerase IV (*parC* e *parE*). Outros mecanismos estão envolvidos na resistência, tais como a presença da proteína Qnr, codificada por genes plasmidiais (*qnr*) e que protege a topoisomerase da ação das quinolonas (MIRÓ *et al.*, 2004).

Destacam-se também os mecanismos de resistência antimicrobiana relacionados a alterações nas porinas ou nos polissacarídeos de membrana, que diminuem a penetração dos antimicrobianos na bactéria e a expressão de bombas de efluxo para expulsar os antimicrobianos do interior do micro-organismo (MIRÓ *et al.*, 2004).

Além das resistências antimicrobianas associadas às variações genéticas, transposons e plasmídios, mais recentemente foram descritos, em bactérias gram negativas, um novo grupo de elementos capazes de incorporar ao DNA, por recombinação, um cassete de genes de resistência antimicrobiana denominado

integron. Foram isoladas de bactérias envolvidas em casos clínicos, pelo menos nove classes de integrons sendo a mais prevalente a classe 1, codificada pelo gene *qacEΔI* (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Entre os principais genes relacionados à resistência estão: *aadA*, *sul1-sul2*, *dhfr1*, *tetA-tetB*, *floSt*. Estes conferem resistência respectivamente as seguintes classes de antimicrobianos: aminoglicosídeos, sulfonamidas, trimethoprim, tetraciclina e cloranfenicol (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Entre as enzimas beta-lactamases destacamos as AmpC, e KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase), codificadas respectivamente pelos genes *ampC* e *bla_{KPC}*. Os micro-organismos que apresentam a enzima plasmidial AmpC são resistentes a todos os betalactâmicos, exceto aqueles de quarta geração - cefepima, cefepiroma e carbapenemes (PÉREZ-PÉREZ, HANSON, 2002). Aqueles que apresentam a enzima plasmidial KPC possuem o mais prevalente mecanismo de resistência a carbapenemes. O fato dos carbapenemes serem usados como tratamento de eleição para as infecções graves causadas por ESBL, juntamente com o aumento da resistência a fluoroquinolonas na família Enterobacteriaceae, levou a um aumento na dependência dos carbapenemos na prática da medicina clínica (ARNOLD *et al.*, 2011).

Outra importante forma de resistência antimicrobiana em bactérias Gram negativas, especialmente na família Enterobacteriaceae, é a produção de betalactamase de espectro estendido (“Extended Spectrum Beta-Lactamase”, ESBL). As ESBL são enzimas geralmente codificadas por plasmídios e classificadas em classes ou grupos de acordo com sua estrutura ou função química (BONNET *et al.*, 2000). As principais enzimas descritas são: TEM, SHV, OXA, CTX-M, codificadas pelos genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{OXA}*, *bla_{CTX-M}*, respectivamente. Essas enzimas inativam uma ampla variedade de drogas beta-lactâmicas incluindo cefalosporinas de terceira e quarta geração, penicilinas e monobactams (GELINSK *et al.*, 2014).

Na América do Sul e no Brasil, a ocorrência de ESBL tem mostrado o predomínio das enzimas CTX-M, e as mais frequentemente encontradas são CTX-M-2, CTX-M-8, e CTX-M-9 (BONNET *et al.*, 2000; GARCIA, *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010; CLÍMACO, MINARIN, COSTA DARINI, 2010; QUEIROZ, 2012; SILVA *et al.*, 2013).

Com o conhecimento da importância da *S. enterica* nas doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo e as inúmeras características de virulência e de

resistência aos antimicrobianos que tem sido encontrada nesses micro-organismos, torna-se relevante o estudo mais detalhado dessas características em *S. enterica* no Brasil.

Dados obtidos de estudos realizados em vários países indicam uma nítida mudança no perfil dos sorotipos de *Salmonella enterica* envolvidos em doença humana, nos últimos anos, tendo a *S. Enteritidis* se tornado o principal sorotipo isolado, em detrimento do *S. Typhimurium*. De forma idêntica ao verificado em todo o mundo, esta mudança também vem ocorrendo no Brasil.

Embora a caracterização antigênica conclusiva represente ferramenta relevante na identificação dos sorotipos prevalentes, epidêmicos e exóticos (que possam ingressar em nosso meio e representar condições de risco), a elevada prevalência de *S. Enteritidis* e os poucos estudos no país relacionados às características de patogenicidade das amostras isoladas, dificultam o conhecimento do efetivo potencial de risco constituído pelas cepas circulantes em nosso meio.

Considerando a relevância de *S. Enteritidis* em Saúde Pública e a sua disseminação entre os animais e humanos empregou-se, na presente investigação, cepas oriundas do Estado do Rio de Janeiro e de outros Estados da Federação.

As cepas da Coleção de Culturas selecionadas para o estudo foram reativadas e avaliadas bioquímica, sorológica e geneticamente e ainda analisadas quanto a presença de genes de virulência presentes nas ilhas de patogenicidade SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 e SPI-5, além de outros genes situados no cromossoma e no plasmídeo de virulência do micro-organismo.

Cepas aviárias e de origem humana foram ainda estudadas quanto à produção de biofilme, presença de curli, produção de celulose, presença de fímbria Tipo I, expressão de flagelos e atividade invasora para enterócitos humanos cultivados *in vitro*.

Considerando-se a exiguidade do conhecimento sobre as características patogênicas de *S. Enteritidis*, é de fundamental importância para a Saúde Pública e para a Saúde Animal, o estudo dos fatores relacionados à patogenicidade das cepas circulantes entre animais e seres humanos. O perfil de genes de virulência, a sua capacidade de produzir biofilme e as suas características de interação com enterócitos humanos podem contribuir para o monitoramento deste patógeno, oferecendo informações importantes para as ações de diagnóstico, prevenção, controle e/ou erradicação da doença no homem e nos animais.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Investigar em *S. Enteritidis* isoladas em diferentes regiões do Brasil, no período 2006-2010 a partir de animais, alimentos e humanos a presença de genes de virulência, incluindo a expressão de adesinas, flagelo e celulose, sua resistência aos antimicrobianos, produção de biofilme e influencia na expressão de genes associados à invasão e atividade invasora para células epiteliais humanas.

1.2 Específicos

Confirmar a identificação de um conjunto de cepas de *S. Enteritidis* por métodos bioquímicos, imunológicos e moleculares;

Identificar genes de virulência plasmidiais e cromossômicos, contidos nas ilhas de patogenicidade SPI-1, SPI-2, SPI-3, SPI-4 e SPI-5;

Avaliar a resistência antimicrobiana e a presença de genes relacionados.

Comparar, em um subconjunto de cepas humanas e aviárias a produção de biofilme, expressão de curli, produção de celulose e expressão de pili tipo 1 e flagelos;

Investigar a expressão fenotípica dos genes da ilha SPI-1 através de testes quantitativos de invasão de enterócitos humanos cultivados *in vitro*;

Avaliar entre cepas fortemente produtoras de biofilme a capacidade de invasão de células Caco-2;

Avaliar a expressão dos genes de virulência da SPI-1 na condição de cultivo planctônica e em biofilme.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas

2.1.1 Cepas e critérios de seleção

Avaliou-se 163 cepas de *S. Enteritidis*, distribuídas em três grupos distintos: cepas de origem animal (aves e bovinos), cepas de origem alimentar e cepas de origem humana.

O primeiro grupo (origem animal) era constituído por cepas oriundas de vários Estados da Federação, e foram isoladas em laboratórios pertencentes à rede do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, e recebidas para a caracterização antigênica no Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (LABENT).

O segundo (origem alimentar) e o terceiro (doença humana-gastroenterites ou bacteremias) grupos eram formados por cepas pertencentes à coleção do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz. Estas cepas são oriundas dos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) situados em distintos locais do país. Os LACEN vinculam-se às Secretarias Estaduais de Saúde, e fazem parte do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública – SISLAB. Nestes dois grupos também foram incluídas cepas isoladas ou encaminhadas por institutos de pesquisa e universidades públicas. Estas foram isoladas nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão e Pernambuco), Centro Oeste (Distrito Federal, Goiás e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Nos **Quadros 1 a 5**, estão apresentadas as principais informações fornecidas pelas instituições remetentes referentes às cepas de *S. Enteritidis* empregadas neste estudo.

Nº IOC	ESTADO	REGIÃO	FONTE DE ISOLAMENTO	ORIGEM
619	SP	Sudeste	Frango carcaça	AL
2191	RS	Sul	Bovino	AL
3478	RS	Sul	Frango	AL
4901	PR	Sul	Bovino carne <i>in natura</i>	AL
5537	SC	Sul	Frango	AL
5620*	RS	Sul	Frango	AL
5641	SP	Sudeste	Bovino carne <i>in natura</i>	AL
6664	SP	Sudeste	CMS - bovino	AL
7503	MT	Centro-Oeste	Carne bovina	AL
11348	SC	Sul	Frango	AL
11466*	SC	Sul	Frango	AL
11519	SP	Sudeste	Bovino Carne <i>in natura</i>	AL
11531	MT	Centro-Oeste	Bovino Carne assada	AL
11959	RS	Sul	Bovino Carne moída	AL
3749	SC	Sul	Bovino	AN
6477	MS	Centro-Oeste	Frango	AN
8309	PR	Sul	Órgãos - frango	AN
10173	SC	Sul	Bovino	AN
10253	RS	Sul	Frango	AN
10270	RS	Sul	Frango	AN
10318	RS	Sul	Frango	AN
10350	RS	Sul	Frango	AN
281	SC	Sul	Indeterminado	HU
282	SC	Sul	Indeterminado	HU
290	SC	Sul	Indeterminado	HU
375	ES	Sudeste	Indeterminado	HU
495	AM	Norte	Indeterminado	HU
2509*	BA	Nordeste	Indeterminado	HU
9360*	BA	Nordeste	Indeterminado	HU
11477*	ES	Sudeste	Indeterminado	HU
12009*	MT	Centro-Oeste	Indeterminado	HU
12014*	PE	Nordeste	Indeterminado	HU

CMS=Carne Mecanicamente Separada. HU- humana; AL- alimento; AN- animal; * - cepas com antibiograma.

Fonte: FIOCRUZ/IOC/LABENT.

Quadro 2 – Cepas de *S. Enteritidis* isoladas no ano 2007

Nº IOC	ESTADO	REGIÃO	FONTE DE ISOLAMENTO	ORIGEM
3561	RS	Sul	Frango	AL
4496*	SC	Sul	Bovino - carne cozida	AL
4791	MT	Centro-Oeste	Frango	AL
4991*	SP	Sudeste	Frango	AL
5452	PR	Sul	Bovino	AL
5463	PR	Sul	Bovino - carne assada	AL
5495	PR	Sul	Bovino - carne assada	AL
5523	PR	Sul	Bovino - bife	AL
5535	PR	Sul	Bovino - costela assada	AL
5543	PR	Sul	Frango	AL
5545	PR	Sul	Frango	AL
5546	PR	Sul	Frango	AL
5548	PR	Sul	Frango	AL
8838	GO	Centro-Oeste	Frango	AL
8884	GO	Centro-Oeste	Frango	AL
9200	RS	Sul	Frango	AL
9836	MT	Centro-Oeste	Frango	AL
10182*	SC	Sul	Carne bovina	AL
10808	SP	Sudeste	Frango	AL
10814	SP	Sudeste	Carne bovina	AL
12602	SC	Sul	Frango	AL
13107*	MG	Sudeste	Hamburguer bovino	AL
13108*	MG	Sudeste	Hamburguer bovino	AL
700	SP	Sudeste	Ovos bicados	AN
2912	SP	Sudeste	Ovos bicados	AN
6759	SP	Sudeste	Ovos bicados	AN
6775	PR	Sul	Ovos bicados	AN
12677	PR	Sul	Frango	AN
317*	SC	Sul	Indeterminada	HU
1418*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
1899*	CE	Nordeste	Hemocultura	HU
8064	RJ	Sudeste	Sangue	HU
8276	MG	Sudeste	Fezes	HU
9451*	PA	Norte	Indeterminada	HU
10620*	SE	Nordeste	Fezes	HU
11720*	MG	Sudeste	Fezes	HU
12847*	PR	Sul	Indeterminada	HU
12851*	PR	Sul	Indeterminada	HU
12872*	PR	Sul	Indeterminada	HU
12873*	PR	Sul	Sangue	HU
12883*	PR	Sul	Sangue	HU
13439*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
13440*	RJ	Sudeste	Sangue	HU

HLLU- humana; AL- alimento; AN- animal; * - cepas com antibiograma.
 Fonte: FIOCRUZ/IOC/LABENT.

Quadro 3 – Cepas de *S. Enteritidis* isoladas no ano 2008

Nº IOC	ESTADO	REGIÃO	FONTE DE ISOLAMENTO	ORIGEM
1457	SP	Sudeste	Bovino - carne <i>in natura</i>	AL
4348	RS	Sul	Frango - Coração	AL
8148*	MG	Sudeste	Hambúrguer	AL
8192	SP	Sudeste	Bovino - carne <i>in natura</i>	AL
897	GO	Centro-Oeste	Frango (p.i.)	AL
1329	SC	Sul	Frango	AL
3896	GO	Centro-Oeste	Frango (p.i.)	AL
4136	PR	Sul	Frango (p.i.)	AL
4761	GO	Centro-Oeste	Frango (p.i.)	AL
7457	MT	Centro-Oeste	Frango (p.i.)	AL
130	PR	Sudeste	Indeterminado	AN
1224	RS	Sul	Indeterminado	AN
1825	RS	Sul	Indeterminado	AN
2158	PR	Sul	Indeterminado	AN
3876	RS	Sul	Indeterminado	AN
98	PR	Sul	Aves	AN
193	SP	Sudeste	Frango	AN
709	SC	Sul	Frango	AN
1224	RS	Sul	Fezes	AN
1825	RS	Sul	Mecônio	AN
2*	MG	Sudeste	Fezes	HU
5*	MG	Sudeste	Fezes	HU
74*	PE	Nordeste	Sangue	HU
287*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
661*	DF	Centro-Oeste	Sangue	HU
1352*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
1356*	RS	Sul	Sangue	HU
2404*	MG	Sudeste	Fezes	HU
3337*	SC	Sul	Fezes	HU
4524*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
7751*	GO	Centro-Oeste	Sangue	HU
8936*	RS	Sul	Fezes	HU
3305*	SC	Sul	Indeterminado	HU

HU- humana; AL- alimento; AN- animal; p.i.- produto industrializado;* - cepas com antibiograma.
Fonte: FIOCRUZ/IOC/LABENT.

Nº IOC	ESTADO	REGIÃO	FONTE DE ISOLAMENTO	ORIGEM
1557*	SP	Sul	Frango	AL
2329*	SP	Sul	Frango (cortes)	AL
2688*	RS	Sul	Carne bovina	AL
2695*	RS	Sul	Bovino (churrasco)	AL
5791*	GO	Centro-Oeste	Ave	AL
6977*	SC	Sul	Ave	AL
8806	PR	Sul	Bovino – cortes de carne	AL
8914	MG	Sudeste	Frango	AL
9425	BA	Nordeste	Frango	AL
12969*	SE	Nordeste	Indeterminado	AL
16150*	MG	Sudeste	Indeterminado	AL
16153*	MG	Sudeste	Frango empanado	AL
17311	MG	Sudeste	Indeterminado	AL
17336	PA	Norte	Indeterminado	AL
18127	AL	Nordeste	Indeterminado	AL
1533*	SP	Sul	Mecônio	AN
1987*	SP	Sul	Mecônio	AN
8265	SC	Sul	Galinha matrizes / Tonsilas cecais	AN
92*	SC	Sul	Fezes	HU
3395*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
3398*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
3750*	SC	Sul	Fezes	HU
4647*	RS	Sul	Fezes	HU
4648*	RS	Sul	Fezes	HU
16434*	RS	Sul	Indeterminado	HU

HU- humana; AL- alimento; AN- animal; * - cepas com antibiograma.

Fonte: FIOCRUZ/IOC/LABENT.

Nº IOC	ESTADO	REGIÃO	FONTE DE ISOLAMENTO	ORIGEM
3233*	SC	Sul	Bovino – carne assada	AL
3320*	RS	Sul	Galeto assado	AL
4304*	GO	Centro-Oeste	Bovino – CMS	AL
6199*	GO	Centro-Oeste	Bovino – CMS	AL
8076*	RS	Sul	Carne bovina	AL
9206*	PA	Norte	Frango	AL
9902	GO	Centro-Oeste	Frango (p.i.)	AL
10551*	PE	Nordeste	Frango	AL
11233*	SC	Sul	Frango	AL
11394*	PR	Sul	Bovino – CMS	AL
11528	PR	Sul	Bovino – CMS	AL
12940	PR	Sul	Bovino – CMS	AL
13651*	PR	Sul	Bovino – Cortes	AL
60*	MG	Sudeste	Fezes - Frango	AN
1790*	MG	Sudeste	Bezerro - fezes	AN
2082*	RS	Sul	Frango - swab cloacal	AN
6573*	SP	Sudeste	Frango	AN
7171*	PR	Sul	Frango - swab cloacal	AN
7666*	RS	Sul	Ovos bicados	AN
7686*	RS	Sul	Fezes	AN
8747*	SP	Sudeste	Frango	AN
327*	SC	Sul	Fezes	HU
352*	SC	Sul	Sangue	HU
667*	RS	Sul	Sangue	HU
3235*	SC	Sul	Fezes	HU
3270*	RS	Sul	Fezes	HU
4719*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
5326	PA	Norte	Fezes	HU
5662	DF	Centro-Oeste	Fezes	HU
6369*	MA	Nordeste	Sangue	HU
7152*	CE	Nordeste	Sangue	HU
8805*	RJ	Sudeste	Sangue	HU
10405*	ES	Sudeste	Sangue	HU

CMS- Carne Mecanicamente Separada; HU- humana; AL- alimento; AN- animal; p.i.- produto industrializado; * - cepas com antibiograma.

Fonte: FIOCRUZ/IOC/LABENT.

Para a inclusão das cepas de *S. Enteritidis* nos três grupos analisados (animal, alimento e humano) foram utilizados critérios que visavam obter uma amostragem representativa de cepas circulantes em animais, envolvidas ou não em doença animal,

e aquelas isoladas em espécimes clínicos humanos, nos anos de 2006 a 2010. Para tanto, selecionamos cepas não relacionadas epidemiologicamente, obtidas de casos esporádicos ou utilizamos, no caso de surtos, uma única cepa representante, escolhida ao acaso. Visando estabelecer uma amostragem equilibrada ao longo do período estabelecido para a avaliação, foram selecionadas, dentro dos critérios anteriormente citados, aproximadamente 30 cepas de *S. Enteritidis* para cada ano.

As principais características das cepas de *S. Enteritidis* avaliadas no estudo foram apresentadas na Tabela 1. Verificou-se que nos diferentes anos pesquisados houve uma distribuição similar das cepas. Quanto às regiões, nota-se uma maior frequência de cepas oriundas das regiões Sul e Sudeste, o que ocorre devido ao critério estabelecido quanto ao uso de cepas não relacionadas a um mesmo surto. Nas demais regiões do Brasil, um maior número de isolados provém de surtos, sendo rotineiramente enviadas ao LABENT para a avaliação antigênica. Entretanto, à exceção do ano de 2008, em todos os anos contou-se com cepas oriundas de todas as regiões do Brasil.

Em relação à fonte de isolamento, é possível observar que houve maior ocorrência daquelas isoladas de alimentos (46%), seguidas pelas cepas humanas (33,7%) e de animais (20%). Nestas últimas, 23 cepas originam-se de aves e 10 de bovinos. Quando a fonte de isolamento é alimento encontramos cepas associadas com produtos derivados de aves (39) e de carne bovina (31), sendo algumas cepas provenientes de fonte indefinida (5).

Quanto às cepas de origem humana, foram isoladas de pacientes com infecção sistêmica (sangue, 19 cepas), gastroenterite (fezes, 16 cepas) ou não tiveram a sua origem determinada (20 cepas).

A totalidade das cepas (n=163) foi estocada em meio líquido suplementado com glicerol (20%) a temperatura de -70°C e -20°C, a partir do qual foram efetuados os inóculos necessários para a realização das técnicas e experimentos descritos adiante.

Nas 163 cepas, foi realizada a confirmação bioquímica e antigênica para o sorotipo *S. Enteritidis* e analisada a ocorrência dos genes de virulência das SPI 1 a 5, outros genes cromossomiais relacionados à virulência e o gene

Tabela 1 – Características das cepas de *S. Enteritidis* avaliadas neste estudo

Ano	Região ^(a)	Fonte de isolamento:			Total
		Animais ^(b)	Alimento ^(c)	Humana ^(d)	
2006	NE (3); S (19); N (1); SE (6); CO (3)	8 (25)	14 (43,7)	10 (31)	32
2007	NE (2); S (22); N (1); SE (14); CO (4)	5 (11,6)	23 (53)	15 (34,8)	43
2008	NE (1); S (16); SE (12); CO (4)	10 (30)	10 (30)	13 (39)	33
2009	NE (3); S (10); N (1); SE (10); CO (1)	3 (12)	15 (60)	7 (28)	25
2010	NE (2); S (19); N (2); SE (6); CO (1)	7 (23)	13 (43)	10 (33)	30
Total		33 (20%)	75 (46%)	55 (33,7%)	163 (100%)

(a) Regiões geopolíticas: NE, Nordeste; S, Sul; N, Norte; SE, Sudeste; CO, Centro-Oeste; (n) n° de cepas;

(b) aves (23); bovino (10);

(c) derivados de aves (39); carne crua /cozida (31); indefinida (5);

(d) sangue (19); fezes (16); indefinida (20).

Fonte: Souza, 2015.

plasmidial de virulência. Em 85 cepas selecionadas, foi realizado o teste de sensibilidade antimicrobiana e de genes de resistência para cepas ESBL positivas no teste fenotípico. Em 72 destas cepas foram feitas análises quanto às características fenotípicas e ao genótipo de virulência. Cepas fortemente produtoras de biofilme (n=6) foram selecionadas para avaliação quanto à adesão e invasão de células Caco-2 em condições de cultivo planctônicas e biofilme. A seguir selecionaram-se três destas cepas para verificar a expressão gênica em condições de cultivo planctônicas e biofilme.

2.1.2 Identificação convencional das cepas de S. Enteritidis

A totalidade das cepas selecionadas para o presente estudo fornecidas pelo Laboratório de Referencia Nacional de Enteroinfecções Bacterianas/ Laboratório de Enterobacterias/ IOC/FIOCRUZ, foi submetida à confirmação de seu perfil bioquímico e antigênico e avaliadas também através da PCR (“Polymerase Chain Reaction”) empregando uma sequência randômica cromossômica característica de *Salmonella* spp. e para o gene *sefA*, específico para o grupo D, visando confirmar *S. Enteritidis*.

Para tal, as cepas foram cultivadas em caldo nutriente e incubadas a 37°C por 18 h. Este foi semeado nos meios ágar Hecktoen (Merck), Costa Vernin (Costa; Hoffer, 1972), e LIA (“Lisina Iron Agar”, Merck), e em sequencia confirmadas quanto a sua estrutura antigênica.

Em seguida, estas foram encaminhadas ao Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, onde foram cultivadas em ágar Mueller Hinton (Difco) (20 h, 37°C), sendo preparadas a seguir suspensões densas em caldo infuso-coração (“Brain Heart Infusion”, Difco) suplementado com glicerol bidestilado (Merck) a 20% (v/v). Volumes de 1 mL destas suspensões foram imediatamente transferidos para tubos plásticos com rosca (Cryo-Vials, Nunc) e estocados as temperaturas de -20°C e -70°C, para estoque de trabalho e de longa permanência, respectivamente.

Todas as cepas foram confirmadas como *S. Enteritidis* através da PCR. Para isto, executamos reação de amplificação usando iniciadores para o gene *sefA* e para a sequência randômica cromossômica de 20 e de 23 oligonucleotídeos amplificando produtos de 312 e 429 pb, respectivamente, conforme descrito por Soumet *et al.*

(1999). Nesta PCR, cepas de *S. Enteritidis* mostram-se positivas para ambos os genes, enquanto em *Salmonella* spp. apenas é amplificada a sequência randômica.

Ao longo do trabalho empregamos, como fonte para a execução de todos os procedimentos e ensaios, os estoques bacterianos mantidos sob congelamento, a – 20°C.

2.2 Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

2.2.1 Extração do DNA

As cepas congeladas foram semeadas em caldo nutriente e levadas à estufa bacteriológica a 37°C por 18 h. Em seguida, foram semeadas em placas de ágar Muller Hinton e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 h, sendo o crescimento microbiano utilizado para a extração do DNA.

Para a extração do DNA, uma alíquota do crescimento bacteriano foi dispersa em 1 mL de água ultrapura no interior de microtubo, sendo este aquecido em banho-maria, a 100°C, por 10 minutos e a seguir imerso em banho de gelo. Em seguida, o material foi centrifugado (14.000 g, 1 min.) e o sobrenadante foi recolhido e separado em 5 alíquotas de 100 µL, sendo estas armazenadas em freezer a – 20°C até o momento da execução das reações da PCR.

Como controle negativo para as reações da PCR, empregamos a cepa *Escherichia coli* K-12 DH5α e como controles positivos as cepas protótipo *S. Enteritidis* S.64 e *S. Typhimurium* S.190, pertencentes à Coleção de Cultura do Laboratório de Referencia Nacional de Enteroinfecções Bacterianas/ Laboratório de Enterobacterias/ IOC/FIOCRUZ FIOCRUZ.

2.2.2 Amplificação do DNA Bacteriano

Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) para os genes pesquisados são aqueles descritos anteriormente por Soumet *et al.* (1999), Guerra *et al.* (2000), Soto *et al.* (2006) e Bohez *et al.* (2006), Fardini *et al.* (2007) e Kiss, Morgan e Nagy (2007), indicados no Quadro 6.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 50 μL , com programação de ciclos correspondendo à desnaturação do DNA; anelamento dos iniciadores na região alvo e alongamento da fita de DNA, em diferentes tempos e temperaturas, correspondentes a cada iniciador utilizado, de acordo com a recomendação dos autores citados.

Os reagentes utilizados (Taq DNA polimerase, tampão 10x para PCR, dNTPs e solução de MgCl_2) foram obtidos da Invitrogen e o termociclador empregado foi PTC100 (MJR).

2.2.3 Detecção do produto da amplificação

Concluída a amplificação, a cada microtubo foi adicionado 4 μL do corante de corrida azul de bromofenol, em seguida homogeneizado e colocado 15 μL em cada poço do gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em tampão Tris-Borato-EDTA (TBE; Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM). A eletroforese foi realizada com o mesmo tampão visando a identificação do produto da amplificação e determinação do peso molecular aproximado, empregando-se como marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Esta foi realizada a 72V, durante 60 minutos sendo o gel então corado com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), visualizado sob luz ultravioleta e fotografado pelo sistema digital Digidoc-It (UVP).

Quadro 6 – Iniciadores (“primers”) utilizados para identificação dos genes bacterianos investigados

Gene	Específico para	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')	pb	Referência
Sequência randômica	<i>Salmonella</i> spp.	F: CCAACCATTGCTAAATTGGCGCA	429	Soumet, 1999.
		R: GGTAGAAATTCAGCGGGTACTGG		
sefA	S.Enteritidis (fimbria)	F: AGGTTTCAGGCAGCGGTTACT	312	
		R: GGGACATTTAGCGTTTCTTG		
invE/A	SPI-1 (estrutura do SST3)	F: TGCCTACAAGCATGAAATGG	500	Guerra, <i>et al.</i> , 2000.
		R: AAAGTGGACCACGGTACAA		
orgA	SPI-1 (codifica proteínas efectoras-SPI)	F: GATAAGGCCGAAATCGTCAAATG	540	Soto, <i>et al.</i> , 2006.
		R: GTAAGGCCAGTAGCAAATTTG		
hilA	SPI-1 (regulador da ilha)	F:GGATCAGGTTCAATCCGAGA R: AGTAAGGCGCAATGCTGTTT	500	Bohez <i>et al.</i> , 2006.
sipA	SPI-1 (mobilização de actina)	F: CAAACGTTGATACCCCTGCT R: CGGTCGTACCGGCTTTATTA	766	
sseA	SPI-2 (proteína translocada pelo SST3 da ilha)	F: TTCACCAAATCCGGGCTA R: TCTCGGCCTCCTGGTTAA	135	Fardini <i>et al.</i> , 2007.
ssrB	SPI-2 (regulador transcricional central do sistema SsrA/B)	F: CTTAGTCTACCTGGCATCAATGGC R: CGCTAACAGAAGTTGCTGACTACTGC	177	
mgtC	SPI-3 (sobrevivência intracelular)	F: TGAATATCAATGCTCCAGTGAAT R: ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG	655	Soto, <i>et al.</i> , 2006.
siiE	SPI-4 (adesina c/papel na fase intestinal-doença/bovinos)	F: GCGCAAAAGTTTCTTTCCGGG R: TTTCTGGTTAGTTATCGGCAGAGTAAACTCTTCT	608	Kiss, Morgan & Nagy, 2007.
sopB	SPI-5 (inositol fosfatase-indução de enterite)	F: GATGTGATTAATGAAGAAATGCC R: GCAAACCATAAAAACTACACTCA	1170	Bohez <i>et al.</i> , 2006.
slyA	Regulação transcrição	F: GCCAAAAGTGAAGCTACAGGTG R: GTATCGACCACCACGATGGTT	700	Guerra, <i>et al.</i> , 2000.
phoP/Q	Regulação negativa de SPI-1	F: ATGCAAAGCCCCGACCATGACG R: GTATCGACCACCACGATGGTT	299	
stn	Enterotoxina	F: TTAGGTTGATGCTTATGATGGACACCC R: CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG	617	Soto, <i>et al.</i> , 2006.
spvC	Plasmideo de virulência	F: ACTCCTTGACACAACCAAATGCGGA R: TGTCTTCTGCATTTGCCACCATCA	424	

Fonte: Souza, 2015.

2.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada pelo método de difusão com discos, de acordo com “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2010). Foram selecionadas 85 cepas de *S. Enteritidis*, priorizando aquelas de origem humana (n=48), alimentos envolvidos em surtos (n=27) e animais dos últimos dois anos do período avaliado (n=10). Estas cepas foram apresentadas nos quadros 1 a 5, marcadas com asteriscos. Foram testados 12 antimicrobianos disponíveis comercialmente (Oxoid).

Os antimicrobianos testados e as concentrações dos discos foram as seguintes: Ampicilina (AMP; 10 µg), Ceftriaxone (CRO, 30 µg), Cefalotina (CEP, 30 µg), Cloranfenicol (CHL, 30 µg), Ciprofloxacina (CIP, 5 µg), Gentamicina (GEN, 10 µg), Ácido Nalidixico (NAL, 30 µg), Nitrofurantoina (NIT, 300 µg), Fosfomicina (FOS, 200 µg), Estreptomicina (STR, 10 µg), Tetraciclina (TCY, 30 µg) e Trimetoprim-Sulfametoxazol (SXT, 23,75/1,25 µg).

Os isolados foram categorizados como susceptíveis ou resistentes de acordo com o CLSI (CLSI, 2010). Para assegurar o controle e confiabilidade do teste foi utilizada a cepa *E. coli* ATCC 25922.

2.4 Detecção fenotípica de cepas produtoras de ESBL

As cepas foram avaliadas quanto à produção de ESBL (“Extended Spectrum Beta-Lactamase”) usando o teste sinérgico de duplo disco (RAWAT e NAIR, 2010). As cepas foram inoculadas em Agar Mueller-Hinton (OXOID) e discos contendo quantidades padrão (30 µg) de ceftazidima e cefotaxime foram colocados a 25 mm de um disco central de amoxicilina-ácido clavulânico (20 e 10 µg, respectivamente). Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 18 a 20 horas. O aparecimento de uma zona de inibição evidente entre um dos β-lactâmicos e o disco de amoxicilina-ácido clavulânico, foi interpretado como evidencia presuntiva da presença de ESBL. A cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

2.5 Amplificação de genes de ESBL por PCR

Para a caracterização das beta-lactamases, foi realizada a análise por PCR Multiplex visando verificar a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{OXA}, usando iniciadores (Quadro 7), concentrações de reagentes e condições de ciclagem de acordo com Dallene *et al.* (2010). A cepa *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 e *E. coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente.

Quadro 7 – Iniciadores (“primers”) utilizados para identificação de genes relacionados à ESBL investigados

Gene*	Beta-lactamase alvo*	Sequência de Oligonucleotídeos (5'-3')*	pb*
<i>bla</i> _{TEM}	Variantes TEM, incluindo TEM1, TEM2	F: CATTTCGGTGTGCGCCCTTATTC	800
		R: CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
<i>bla</i> _{SHV}	Variantes SHV, incluindo SHV1	F: AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	713
		R: ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
<i>bla</i> _{OXA}	OXA-1, OXA-4 e OXA-30	F: GGCACCAGATTCAACTTTCAAG	564
		R: GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	Variantes CTX-M do grupo 1 incluindo CTX-M-1, CTX-M-3 e CTX-M-15	F: TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688
		R: CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	Variantes CTX-M do grupo 2 incluindo CTX-M-2	F: CGTTAACGGCACGATGAC	404
		R: CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	Variantes CTX-M do grupo 9 incluindo CTX-M-9 e CTX-M-14	F: TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561
		R: TGATTCTCGCCGCTGAAG	
<i>bla</i> _{CTX-M8/25}	CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-26, e CTX-M-39 a CTX-M-41	F: AACRCRCAGACGCTCTAC	326
		R: TCGAGCCGGAASGTGTYAT	

*Referência: Dallene *et al.*, 2010. Fonte: Souza, 2015.

2.6 Características fenotípicas associadas à virulência em cepas humanas e aviárias

2.6.1 Seleção das cepas

Um subconjunto de 72 estirpes de *S. Enteritidis*, sendo 32 de origem aviária (AL e AN) (Quadro 8) e 40 de origem humana (Quadro 9), foram selecionadas para a avaliação de características fenotípicas associadas à virulência. Tendo em vista a importância das aves na epidemiologia da infecção humana, foi considerado pertinente comparar isolados de aves e de humanos. Para as de origem humana, foram incluídas de coproculturas (n=13) e hemoculturas (n=18). Em 9 de origem humana não foi possível obter informações quanto ao sítio de isolamento.

Na Tabela 2 apresentamos as principais características das 72 *S. Enteritidis* selecionadas para avaliarmos a produção de biofilme, presença de curli, produção de celulose, expressão de pili tipo 1 e flagelos.

Na Tabela 2 pode-se verificar que as *S. Enteritidis* estão distribuídas de forma equitativa ao longo dos 5 anos estudados. Verifica-se ainda que as cepas humanas tem como principal origem sangue (25%) e fezes (18%), enquanto as de origem indeterminada são em menor percentual (12%). Aquelas de origem humana compõem 55% do total, enquanto as de origem aviária são 45%. Estas são originárias de fezes (18%), carcaças (7%) e ovos (6%) sendo 14% de origem indeterminada. As 72 cepas foram selecionadas inclusive, por serem positivas para todos os genes relacionados à virulência pesquisados no presente estudo.

Quadro 8 – Cepas de *S. Enteritidis* de origem aviária (AL e AN) selecionadas para o estudo das características fenotípicas associadas à virulência

Cepa	Ano	Estado	Fonte
60	2010	MG	Fezes
98	2008	PR	Indeterminado
130	2008	PR	Indeterminado
176	2009	PR	Refugo
193	2008	SP	Fezes
700	2007	SP	Ovos bicados
709	2008	SC	Indeterminado
1535	2009	SP	Mecônio
1557	2009	SP	Carcaça
1655	2006	SP	Fezes
1825	2008	RS	Mecônio
1987	2009	SP	Mecônio
2082	2010	RS	Cloaca
2912	2007	SP	Ovos bicados
5543	2007	PR	Carcaça
5546	2007	PR	Carcaça
5548	2007	PR	Carcaça
6573	2010	SP	Fezes
6759	2007	SP	Ovos bicados
6775	2007	PR	Ovos bicados
7171	2010	PR	Cloaca
7666	2010	RS	Fezes
7686	2010	RS	Fezes
8244	2009	SC	Mecônio
8747	2010	SP	Fezes
10253	2006	RS	Indeterminado
10270	2006	RS	Indeterminado
10318	2006	RS	Indeterminado
10350	2006	RS	Indeterminado
11348	2006	SC	Indeterminado
11466	2006	SC	Indeterminado
12667	2007	PR	Indeterminado

Fonte: FIOCRUZ/IOC/LABENT.

Quadro 9 – Cepas de *S. Enteritidis* de origem humana selecionadas para o estudo das características fenotípicas associadas à virulência

Cepa	Ano	Estado	Fonte
2	2008	MG	Fezes
5	2008	MG	Fezes
74	2008	PE	Sangue
92	2009	SC	Fezes
103	2009	SC	Fezes
287	2008	RJ	Sangue
290	2006	SC	Indeterminado
317	2007	SC	Indeterminado
327	2010	SC	Fezes
352	2010	SC	Sangue
495	2006	MA	Indeterminado
661	2008	DF	Sangue
667	2010	RS	Sangue
1352	2008	RJ	Sangue
1356	2008	RS	Sangue
1358	2009	SC	Fezes
1376	2009	SC	Fezes
1899	2007	CE	Sangue
2404	2008	MG	Fezes
3270	2010	RS	Fezes
3337	2008	SC	Fezes
3395	2009	RJ	Sangue
3398	2009	RJ	Sangue
4524	2008	RJ	Sangue
4647	2009	RS	Fezes
4648	2009	RS	Fezes
4719	2010	RJ	Sangue
6369	2010	MA	Sangue
7152	2010	CE	Sangue
7751	2008	GO	Sangue
8064	2007	RJ	Sangue
8805	2010	RJ	Sangue
8936	2008	RS	Fezes
9360	2006	BA	Indeterminado
10405	2010	ES	Sangue
11477	2006	ES	Indeterminado
12009	2006	MT	Indeterminado
12014	2006	PE	Indeterminado
12872	2007	PR	Indeterminado
12873	2007	PR	Indeterminado

Fonte: FIOCRUZ/IOC/LABENT.

Tabela 2 – Principais características de 72 cepas selecionadas de *S. Enteritidis* isoladas no período 2006-2010

Ano de isolamento	nº de cepas	Origem:						
		Humana (n=40)			Aves (n=32)			
		fezes	sangue	IND	fezes ^(a)	carcaça	ovos	IND
2006	13 (18%)	-	-	6 (46%)	1 (8%)	-	-	6 (46%)
2007	15 (21%)	-	2 (13%)	3 (20%)	-	3 (20%)	4 (27%)	1 (7%)
2008	17 (24%)	5 (29%)	7 (41%)	-	2 (12%)	-	-	3 (18%)
2009	13 (18%)	6 (46%)	2 (15%)	-	3 (23%)	2 (15%)	-	-
2010	16 (22%)	2 (12%)	7 (44%)	-	7 (44%)	-	-	-
TOTAL	72 (100%)	13 (18%)	18 (25%)	9 (12%)	13 (18%)	5 (7%)	4 (6%)	10 (14%)

IND: indeterminada; ^(a) fezes, cloaca ou mecônio de aves. Todas as cepas foram positivas, pela PCR, para os genes de virulência *invEA*, *orgA*, *sipA*, *hilA* (SPI-1), *ssrB*, *sseA* (SPI-2), *mgtC* (SPI-3), *siiE* (SPI-4), *sopB* (SPI-5), *spvC* (plasmídeo pENT), *stn*, *slyA*, *phoP/Q*. (ver texto).

Fonte: Souza, 2015.

2.6.2 Produção de Biofilme

Em linhas gerais foi adotado o procedimento descrito por Uhlich *et al.* (2006). As cepas foram cultivadas previamente em 5 mL de caldo LBNS (caldo Luria-Bertani sem adição de sal) (LURIA e BURROWS, 1957) por 18-20 h a 37°C. Deste crescimento bacteriano foi adicionado um volume de 500 µL a 5 mL de caldo LBNS (proporção 1:10); e volumes de 200 µL desta diluição foram depositados em poços (8 poços para cada cepa) de microplaca de poliestireno estéril de 96 poços com fundo plano, não tratada para cultura de células (Corning, ref. 3395). A microplaca foi tampada, vedada com filme plástico para evitar evaporação e incubada a 28°C por 48 h. Como controle foi utilizado LBNS estéril, também em 8 poços. Após a incubação, as suspensões bacterianas foram removidas dos poços por aspiração e estes foram lavados suavemente com PBS (salina tampão fosfato 0,1M pH 7,2). Em seguida, para fixar as bactérias aderidas ao plástico colocou-se 200 µL de metanol 100% por 10 minutos, este foi removido e a microplaca foi deixada secar à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos. Adicionou-se 200 µL de cristal violeta 0,1% a cada poço, e após 20 minutos, o corante foi removido imergindo-se por três vezes a microplaca em bandejas contendo água destilada. Após a completa secagem, adicionou-se 200 µL de ácido acético a 30% a cada poço, aguardando-se 15 minutos para a solubilização do corante. O conteúdo dos poços foi misturado e removido 125 µL para poços de uma microplaca de poliestireno de fundo plano, evitando-se a exposição à luz, até o momento da leitura. A densidade ótica foi medida a 540 nm em espectrofotômetro (WPA-Colorwave, modelo CO7500). Cada ensaio foi repetido em triplicata. Como controles da formação de biofilme foram utilizadas as cepas *S. Typhimurium* C20 (controle positivo) e *E. coli* K12 HB101 (controle negativo).

2.6.3 Quantificação do biofilme produzido

Para a quantificação do biofilme utilizou-se o critério descrito por Stepanovic *et al.* (2004). Com base nos valores da leitura da D.O. a 540nm, as cepas foram classificadas em quatro categorias: não produtoras, produtoras fracas, moderadamente produtoras e fortemente produtoras. O valor *cut-off* para a D.O. (D.O. c) foi definido como três desvios padrão acima da D.O. média do controle negativo (meio LBNS estéril). As cepas foram então classificadas: $D.O. \leq D.O.c$ = não

produtoras; $D.O.c < D.O. \leq (2 \times D.O.c)$ = fracamente produtoras; $(2 \times D.O.c) < D.O. \leq (4 \times D.O.c)$ = moderadamente produtoras; $(4 \times D.O.c) < D.O.$ = fortemente produtoras. Como citado, todos os testes foram realizados em triplicata e as médias foram calculadas. Foi realizado o Teste T de Student, e os valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

2.6.4 Pesquisa do gene *bap*

Foi investigada a presença do gene *bap* relacionado à produção de biofilme. Para tanto, foi realizada a PCR de acordo com Biswas *et al.* (2010), sendo a sequência de iniciadores a seguinte:

Forward: 5'-GCCATGGTGCTGGAAGGCCTGGCGGTT- 3';

Reverse: 5'-GGTCGACGGGAAGGGTAAAATGACCTTC- 3'

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 μ L, de acordo com a recomendação dos autores citados, e foi realizada a seguinte programação: desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos incluindo desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (50 °C por 45 segundos) e extensão (72°C por 1 minuto). A extensão final foi de 72°C por 5 minutos. Os reagentes utilizados (Taq DNA polimerase, tampão 10x para PCR, dNTPs e solução de $MgCl_2$) foram obtidos da Invitrogen e o termociclador empregado foi PTC100 (MJR).

Do produto da PCR foi feita a eletroforese em gel de agarose a 1,5% (Invitrogen) com brometo de etídio (0,5 μ g/mL), em tampão 1x Tris–EDTA. O marcador de peso utilizado foi 100-bp DNA ladder (Invitrogen). O gel foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado pelo sistema digital Digidoc-It (UVP).

2.6.5 Expressão de Curli

Empregamos as 72 cepas de *S. Enteritidis* referidas no item 2.6.1. Para a detecção da expressão de curli, utilizamos os procedimentos descritos por Kim e Kim (2004). Resumidamente, após cultivo em caldo LB (18-20 h, 37°C) as cepas foram semeadas, por esgotamento, em placas de Agar CFA (Colonization Factor Antigen Agar) (EVANS e EVANS, 1978) suplementado com 40 mg/L de Vermelho Congo (Sigma). Em seguida, as placas foram incubadas a 28°C por 48 h, e a seguir

examinadas para a formação de colônias com cor vermelha, características da expressão de curli. A ocorrência de colônias incolores (cor do meio) indica a ausência da expressão de curli. Como controles, usamos as cepas *S. Typhimurium* C20 (curli positivo) e *E. coli* K12 HB101 (curli negativo).

A fímbria curli é do tipo amiloidal, e o vermelho congo tem a característica de se ligar a proteínas amiloidais, formando colônias vermelhas quando há a presença de curli.

2.6.6 Verificação da produção de Celulose

Empregamos as 72 cepas de *S. Enteritidis* referidas no item 2.6.1. Para a detecção da produção de celulose, adotamos o procedimento descrito por Römbling *et al* (2003). Utilizamos o meio Agar LBNS (LBNS acrescido de ágar 1,5%) suplementado com o corante calcoflúor (fluorescent brightner 28; Sigma). Neste meio, as colônias positivas para a produção de celulose fluorescem quando submetidas à luz UV (366 nm). Inicialmente, cultivamos as cepas em 5mL de caldo LB a 37°C por 18h-20h e 10 µL do cultivo foi semeado em “spot” em placas com Agar LBNS com 50 µM de calcoflúor. Em cada placa semeamos 6 cepas, além da cepa controle positiva, esta inoculada no centro da placa. As placas foram incubadas por 48h a 28°C e a leitura foi realizada em câmara escura, com exposição à luz UV. As cepas positivas apresentam fluorescência verde-azulada (RÖMLING *et al.*, 2003). Como controles, foram utilizadas as cepas *S. Typhimurium* C20 (celulose positiva) e *E. coli* K12 HB101 (celulose negativa).

As colônias que produzem celulose quando crescem, apresentam-se fluorescentes devido à ligação da celulose com o calcoflúor.

2.6.7 Verificação da expressão de Pili (fímbria) tipo 1

As 72 cepas de *S. Enteritidis* referidas no item 2.6.1 foram utilizadas. Para a detecção da expressão de pili tipo 1 empregou-se o teste de aglutinação de células de levedura em lâmina de vidro, como descrito por Korhonen, Leffler e Svanborg Edén (1981).

2.6.7.1 Estimulação da expressão de Pili Tipo 1

Cada cepa de *S. Enteritidis*, além da cepa controle, foi inicialmente semeada em tubo de ensaio 18x100mm contendo 5 mL de caldo nutriente (sem glicose, Oxoid). Após incubação estática a 37°C por 48h, foi feito novo repique em caldo nutriente, seguindo-se nova incubação. Em cada repique, apenas foi tocada a superfície do meio com a alça bacteriológica. Foram feitos 4 repiques sucessivos, com a finalidade de enriquecer a cultura com a fase fimbriada, que tende a crescer vigorosamente na interface ar-líquido. Após o último repique, procedíamos a testagem da presença de Pili Tipo I.

2.6.7.2 - Teste de aglutinação de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) em lâmina de vidro

Para o teste, foi preparada suspensão de levedura a 5% (p/v) em salina 0,9% (p/v). Após lavagem, foi preparada suspensão em salina-glutaraldeído 1% (p/v), mantida sob refrigeração. No momento do uso, a concentração da suspensão de levedura foi ajustada a 3% (p/v) com salina. Para o preparo da suspensão bacteriana, 1 mL do cultivo descrito no item anterior foi centrifugado (14.000 x g / 4min) e o pellet bacteriano foi ressuspenso em 150 µL de salina 0,9%.

Para a execução do teste, em lâmina de vidro escavada (tipo VDRL) foram depositados 30 µL de suspensão de levedura com D-manose (3%, p/v) e em outra escavação, levedura sem D-manose. Em seguida foi adicionado 30 µL da suspensão bacteriana em cada escavação. Cada cepa bacteriana foi testada para aglutinação das leveduras na presença e ausência de D-manose. Após misturar as suspensões na lâmina com uma ponteira, agitou-se a placa com movimentos suaves de rotação, até ocorrer aglutinação das leveduras. A ocorrência de aglutinação somente na escavação com suspensão bacteriana sem D-manose sugere a presença de fímbria tipo 1 na cepa testada. Como controles, empregamos escavação contendo apenas levedura e salina (controle negativo) e a cepa *S. Typhimurium* C-20 (positiva para pili tipo 1).

2.6.8 Expressão de flagelo e motilidade das cepas bacterianas

As 72 cepas de *S. Enteritidis* referidas no item 2.6.1. foram utilizadas para as análises. Na avaliação da expressão de flagelo e motilidade das cepas bacterianas, inicialmente os micro-organismos foram cultivados em 5 mL de caldo LB a 37°C por 18 h. Em seguida, inoculou-se 1 µL da cultura no centro de duas placas (150 mm. de diâmetro) de ágar LB semi sólido (0,3% (p/v) de agar). As placas foram incubadas invertidas, por 7 h a 37°C, com observações a cada 2 horas, para acompanhar a evolução do halo de crescimento bacteriano que se expandiu a partir do ponto de inoculação. Após 7 h, foi feita a medida do diâmetro do halo de crescimento, em milímetros. A média das duas placas corresponde à motilidade relativa da cepa bacteriana. Os procedimentos foram realizados de acordo com Chuang *et al.* (2008).

2.6.9 Atividade invasora para enterócitos humanos (linhagem celular Caco-2)

2.6.9.1 Cultivo e preparo dos inóculos bacterianos

As cepas bacterianas foram cultivadas em tubos 16x100 mm contendo 5mL de TSB ("Tryptic Soy Broth"; Difco) e incubadas por 18 horas a 37°C sem agitação. Em seguida, 1 mL do cultivo bacteriano foi centrifugado (14000 x g, 4 min.), as bactérias foram ressuspensas em 1 mL de PBS e foram preparadas suspensões padronizadas em PBS (D.O. 0,1 a 640 nm) contendo 10⁸ unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL). Como controle positivo para a invasão usamos a cepa *S. Typhimurium* C20 e como controle negativo a cepa *E. coli* K12 DH5α.

2.6.9.2 Cultivo e manutenção da linhagem celular Caco-2

A linhagem celular Caco-2 (adenocarcinoma de colon humano; ATCC HTB 37) foi cultivada em meio D-MEM (Eagle's Minimal Essential Medium, modificação de Dulbecco; Sigma) suplementado com 0,5% de L-glutamina (Merck), 1% de aminoácidos não-essenciais (Invitrogen) antibióticos (gentamicina 50µg/mL; fungizona 2,5µg/mL) e 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB; Invitrogen). O cultivo foi feito em frasco plástico com faces planas (TPP), incubado a 37°C, em ar enriquecido com 5% de CO₂.

2.6.9.3 Preparo dos tapetes celulares para o teste de invasão

O tapete celular crescido em um frasco foi tratado com solução tripsina-EDTA e volumes adequados foram distribuídos nos poços de placas para cultura de células de 24 poços (Tissue Culture Test Plates, 24 wells; TPP). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ pelo tempo desejado, de forma a obterem-se tapetes pós-confluentes, polarizados e diferenciados (cerca de 12 dias de incubação). Para isto, o meio que banha os tapetes de Caco-2 foi substituído a cada 48 horas, até completar-se o tempo desejado.

2.6.9.4 Teste quantitativo de invasão

Foram adotados os procedimentos descritos por Rosa *et al.*(2001). Os tapetes de Caco-2 foram lavados duas vezes com PBS, cobertos com meio de infecção (D-MEM completo, sem antibióticos e com 2% de SFB e 1% de D-manose) e desafiados com 10⁷ bactérias / tapete celular. Após 2 horas de incubação a 37°C (em atmosfera com 5% de CO₂), em metade dos poços da microplaca os tapetes foram lavados com PBS e em seguida incubados por 1 hora com D-MEM contendo 100 µg/mL de amicacina de forma a eliminar-se as bactérias extracelulares. Nos demais poços os tapetes foram tratados de forma semelhante, mas sem o uso de amicacina. Todos os tapetes foram novamente lavados com PBS e a seguir foram lisados com Triton X-100 (1%), sendo feita a contagem de UFC/mL no lisado, após semeadura em placas de TSA ("Tryptic Soy Agar", DIFCO) e incubação a 37°C por 18 horas. Todas as cepas de *S. Enteritidis* testadas foram previamente avaliadas quanto a sua susceptibilidade à amicacina.

2.6.9.5 Determinação dos índices de invasão e associação

O número de UFC/mL no lisado dos tapetes celulares tratados por amicacina expressa o número de bactérias intracelulares (protegidas do antimicrobiano). A contagem de UFC/mL no lisado dos tapetes celulares não tratados por amicacina expressa o total de bactérias (extracelulares e intracelulares) associadas às células. O índice de invasão é a razão entre bactérias intracelulares / bactérias associadas x100, enquanto o índice de associação é a razão entre bactérias associadas / inóculo

bacteriano inicial x 100. Os testes de invasão foram realizados em triplicata, com pelo menos 2 ensaios independentes.

2.7 Investigação da capacidade de associação e invasão de cepas fortemente produtoras de biofilme em cultivo planctônico (bactérias planctônicas) e em biofilme (bactérias sésseis)

Após a definição do perfil geral das cepas de *S. Enteritidis* quanto à produção de biofilme, cepas fortemente produtoras foram selecionadas formando um subconjunto, com o intuito de investigar a relação da produção de biofilme com a capacidade do micro-organismo associar-se e invadir enterócitos humanos (célula Caco-2).

Seis cepas de *S. Enteritidis* selecionadas foram selecionadas e como controle positivo, usamos a cepa *S. Typhimurium* C20.

2.7.1 Condições de cultivo das cepas bacterianas

Para este ensaio, adotaram-se condições especiais para o cultivo em biofilme. Volumes de 5 mL de LBNS foram depositados nos poços de microplaca de 6 poços (Corning) e cada um deles foi imediatamente semeado com 500 µL de um cultivo estacionário da cepa bacteriana (TSB ou LB, 18 h a 37°C). Para cada cepa, foram utilizados os 6 poços da microplaca. Após 24 horas de incubação a 28°C, sem agitação, trocou-se o meio e a placa foi novamente incubada até completar 48 h. Doze horas antes do término da incubação o meio foi novamente trocado. Concluído o tempo, o meio foi removido, os poços foram lavados com 3-5 mL de PBS por 3 vezes e o crescimento bacteriano aderido ao plástico foi recolhido com PBS após raspagem vigorosa com “cell scraper” (produto 99002, TPP). Em seguida, a suspensão bacteriana resultante foi passada por dez vezes em seringa (3 mL) equipada com agulha 25x8, visando dissociar bactérias agrupadas no biofilme (células sésseis). Concluída a homogeneização, as suspensões foram ajustadas para a D.O. de 0,2 a 680 nm (10^8 UFC/mL) e imediatamente empregadas nos testes de invasão. A observação direta por microscopia de fase e a contagem de colônias em meio sólido indicaram que a homogeneização dissocia eficientemente as bactérias provenientes do biofilme. Já para o cultivo planctônico, as cepas bacterianas foram repicadas em 5

mL de meio e incubadas por 18 h a 28°C, sem agitação. As suspensões bacterianas resultantes do cultivo planctônico foram também submetidas ao mesmo tratamento dos cultivos em biofilme.

2.7.2 Teste quantitativo de invasão

Para a comparação da atividade invasora das cepas cultivadas nas duas condições (cultivos planctônico e em biofilme) foi utilizado o teste quantitativo de invasão nas mesmas condições descritas nos itens 2.6.8.4 e 2.6.8.5, exceto pela utilização de inóculos bacterianos mais densos (10^8 bactérias por tapete celular) e um menor tempo de infecção (1 hora).

2.8 **Observação da invasão bacteriana por microscopia de fase/fluorescência**

Para ensaios destinados a observação microscópica do processo de invasão por imunofluorescência e/ou microscopia de fase, foram adotados em linhas gerais os procedimentos descritos para o teste de invasão, porém, com algumas diferenças importantes: as células foram cultivadas sobre lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro), não empregou-se amicacina e após o período inicial de infecção (15 minutos ou 1 h, conforme o ensaio desejado) as células foram lavadas com PBS e a seguir fixadas com PBS-paraformaldeído 2% por 15 minutos, a temperatura ambiente. Em alguns ensaios, além da célula Caco-2 usou-se a linhagem celular humana HEp-2 (carcinoma de laringe; ATCC CCL-23), pois é mais delgada do que a célula Caco-2 e facilita a observação do citoesqueleto.

2.8.1 Demonstração da localização intracelular ou extracelular das bactérias por microscopia de fluorescência (dupla marcação)

Para confirmar microscopicamente a invasão de *Salmonella enterica* cultivadas em condição planctônica e em biofilme, realizamos a imunofluorescência de dupla marcação em monocamadas de células Caco-2 infectadas por 1 hora. Na dupla marcação, foram utilizados anticorpos antibacterianos e anticorpos secundários conjugados a diferentes moléculas fluorescentes, sendo que antes da segunda reação

com o anticorpo antibacteriano as células são permeabilizadas, permitindo assim o acesso dos anticorpos ao compartimento intracelular.

Como descrito no item anterior, os tapetes celulares infectados foram fixados com paraformaldeído. A seguir, foram lavados 3 vezes com PBS e a seguir bloqueados com PBS adicionado de 2% de albumina bovina (BSA, Sigma) por 30 minutos. A albumina bovina reduz a ligação inespecífica dos anticorpos. Para a marcação das bactérias extracelulares, a solução bloqueadora foi removida e adicionou-se o anticorpo antibacteriano específico (IgG de coelho; anticorpos para *Salmonella enterica* grupos B [4,12] ou D [9,12]; Fiocruz) diluído a 1:50 em PBS, por 60 minutos, a temperatura ambiente. Após a ligação do anticorpo as bactérias extracelulares, os tapetes celulares foram lavados com PBS, novamente bloqueados com PBS-BSA e recobertos com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho [cabra]-Alexa 594 - vermelho; Molecular Probes) diluído a 1:200 em PBS-BSA. Após 60 minutos, no escuro, os tapetes foram lavados com PBS, e a seguir permeabilizados com PBS-0,1% Triton X-100 (Merck), por 10 minutos. Para a marcação das bactérias intracelulares o tapete celular foi novamente incubado com o anticorpo antibacteriano, como já descrito. Após lavagem com PBS e bloqueio com PBS-BSA 2%, os tapetes foram recobertos com anticorpo secundário (anti-IgG de coelho [cabra]-Alexa 488 - verde; Molecular Probes) diluído a 1:200 em PBS-BSA, por 60 minutos. A seguir os tapetes foram lavados com PBS, recobertos com DAPI (4,6-diamino-2-phenylindone dihydrochloride; Molecular Probes) a 0,5 µg/ml em PBS por 1 minuto e lavados com água deionizada.

2.8.2 Observação microscópica da mobilização de actina por *Salmonella enterica*

Para avaliar a mobilização da actina do citoesqueleto por cepas de *S. enterica* cultivadas em condição planctônica e em biofilme, as células foram infectadas por 15 minutos e a seguir marcadas as bactérias e a actina do citoesqueleto com fluorocromos distintos. Para este ensaio foram utilizadas, além da célula Caco-2, a linhagem celular HEp-2. Esta última, além de permissiva para a invasão por *S. enterica*, é mais delgada do que a célula Caco-2, facilitando a observação do citoesqueleto.

Após 15 minutos de infecção, os tapetes celulares foram lavados, fixados com paraformaldeído e permeabilizados com Triton X-100, como descrito anteriormente.

Para a marcação das bactérias, foram utilizados os anticorpos antibacterianos e o anticorpo secundário conjugado com Alexa 594, como já descrito. A seguir, os tapetes foram lavados com PBS e incubados com 2 unidades de faloidina conjugada ao fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes) diluída em PBS, por 60 minutos. A faloidina liga-se especificamente a actina polimerizada. Após lavagem com PBS, os tapetes foram recobertos com solução de DAPI, lavados com água deionizada e montados em resina ProLong Gold.

2.8.3 Montagem e observação das lamínulas

Concluído o procedimento de marcação, as lamínulas foram imersas rapidamente em água destilada, o excesso de água foi removido e as lamínulas foram montadas em uma lamina, sobre uma gota da resina ProLong Gold (Molecular Probes). Essa resina retarda o processo de perda da fluorescência (“quenching”) e permite que as lâminas sejam estocadas envoltas em papel alumínio, a 4°C, por um longo período. As lamínulas foram observadas em microscópio de fluorescência (Axioplan 2, Zeiss) utilizando filtro para dupla marcação (TRITC/ FITC) e filtro para DAPI e objetiva de 100X. Imagens de fluorescência e contraste de fase foram adquiridas com uma câmara digital (AxioCam MR3, Zeiss) e capturadas em computador, sendo posteriormente processadas com o aplicativo Adobe Photoshop 7.0.

2.9 **Microscopia eletrônica de transmissão**

A técnica empregada foi de contrastação negativa para revelar a presença de curli em *S. enterica*. Colônias positivas ou negativas para curli crescidas em placas de Agar CFA-Vermelho Congo foram gentilmente dispersas em gotas de tampão Tris-HCl (0,1M, pH 7,2). Sobre as suspensões bacterianas, deixou-se flutuar grades de níquel (200 mesh) recobertas com filme de Formvar e carbonadas. Após 10 minutos, as grades foram recolhidas e transferidas sucessivamente em água deionizada e em solução de acetato de uranila (2%), por 30 segundos. Após remover o excesso do corante com papel de filtro, as grades foram deixadas secar por uma noite e em seguida mantidas em dessecador até o momento da observação. Empregou-se um microscópio eletrônico Zeiss EM 906 (LABMEL, UERJ), operando a 80 kV.

2.10 RT-qPCR para verificação da expressão de genes da ilha SPI-1 em cepas cultivadas em condição planctônica e em biofilme

Os níveis de transcritos de *sipA*, *hilA* e *invA* de cepas de *Salmonella* cultivadas em condição planctônica e em biofilme foi acompanhado através de da PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR). Para tanto, avaliamos o nível de expressão das respectivas proteínas, codificadas na ilha SPI-1, convertendo o mRNA em cDNA e quantificando-o através do RT-qPCR (Reverse Transcription-qPCR). Os genes selecionados são requeridos para a atividade invasora às células epiteliais. Neste ensaio, foram empregadas as cepas *S. Enteritidis* 10318/6, 1352/8 e 8064/7 e a cepa *S. Typhimurium* C20. Como controle endógeno, foi utilizada sequencia do gene 16S do RNA ribossomal.

2.10.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

O cultivo das cepas em condição planctônica ou em biofilme foi feito conforme descrito no item 2.7.1.

Os pellets bacterianos resultantes de 1 mL de cada cultivo (10^7 UFC/mL) foram ressuspensos em 200 μ L de tampão TE (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8,0) acrescido de 8,3 U/mL de lisozima, homogeneizados e incubados a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 600 μ L de tampão RLT (Qiagen) acrescido de β -mercapto-etanol. O lisado foi transferido para uma coluna gDNA Eliminator (Qiagen) e centrifugado. Adicionou-se ao filtrado 1 volume de etanol 70% gelado, misturando gentilmente por pipetagem, e transferindo 700 μ L do filtrado para coluna RNeasy Mini Spin (Qiagen), centrifugada a seguir. O filtrado foi descartado e a coluna foi eluída, sucessivas vezes, com tampões de lavagem RW1 e RPE (Qiagen). Finalmente, adicionou-se 500 μ L de tampão RPE e após centrifugação a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5mL adicionando-se, diretamente na membrana da coluna, 30 μ L de água livre de RNase (Sigma) e centrifugando por 1 minuto a 8000 x g, para eluição do RNA. Essa etapa foi repetida, passando-se novamente o eluato pela coluna. Para a eliminação de traços de DNA, o RNA foi tratado com turbo DNase-free (Ambion) e após adição do reagente de inativação da DNase (Ambion) e centrifugação o RNA foi

transferido para um novo tubo. Finalmente, uma alíquota contendo 3 µL foi retirada para dosagem do RNA em espectrofotômetro NanoVue (General Electric). Para a síntese de cDNA, foi imediatamente utilizado 100 ng de RNA, ou congelado a -80°C até o momento do uso.

O cDNA foi sintetizado utilizando-se o kit Superscript III First Strand Synthesis System-RT PCR (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Em linhas gerais, 100 ng do RNA foi misturado com 50 ng/µL de hexâmeros randômicos e 10 mM de um mix de dNTP. A mistura foi incubada a 65°C por 5 minutos e colocada em gelo por 1 minuto. A essa mistura foram acrescentados 2 µL de tampão 10X RT, 4 µL de 25 mM MgCl₂, 2 µL de 0,1M DTT e 1 µL de RNaseOUT (40 U/µl) e 1µL SuperScript III RT (200 U/µl), seguindo-se incubação por 10 min a 25°C, 50 min a 50°C e 5 min a 85°C. Foi adicionado 1 µl de RNase H a cada um dos tubos e estes foram incubados por 20 min a 37°C. O cDNA assim sintetizado foi estocado a -20°C até os experimentos de qPCR.

2.10.2 Execução da PCR quantitativa em Tempo Real (qPCR)

Para a avaliação da expressão de *sipA*, *hilA*, *invA*, e *16S-rRNA* (controle endógeno), foram empregados os primers e condições de ciclagem descritas por Abernathy *et al.* (2013) e Rahn *et al.* (1992), apresentados no **Quadro 9**.

A qPCR foi realizada utilizando o termociclador ABI 7500 System (Applied Biosystems) e o kit GoTaq qPCR Master Mix (Promega). O cDNA foi diluído 5 vezes e 1 µL deste foi adicionado à 14 µL do mix de reação, que continha 7,5 µL do 2XGoTaq qPCR Master Mix, as concentrações estabelecidas dos iniciadores, completando com água livre de nucleases até o volume final de 15µL.

Para determinar a melhor concentração de cDNA foi realizada a curva padrão com diferentes diluições do material genético da cepa controle *S. Typhimurium* C20.

Quadro 10 – Iniciadores (“primers”) utilizados na RT-qPCR

Genes	Sequencia de oligonucleotídeos(5'-3')	Referências
<i>sipA</i>	F: CGTCTTCGCCTCAGGAGAAT	Abernathy <i>et al.</i> , 2013.
	R: TGCCGGGCTCTTTCGTT	
<i>hilA</i>	F: ATAGCAAACCTCCCGACGATG	Abernathy <i>et al.</i> , 2013.
	R: ATTAAGGCGACAGAGCTGG	
<i>invA</i>	F: GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA	Rahn <i>et al.</i> , 1992.
	R: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	
16S- <i>rRNA</i>	F: AGGCCTTCGGGTTGTAAAGT	Abernathy <i>et al.</i> , 2013.
	R: GTTAGCCGGTGCTTCTTCTG	

Fonte: Souza, 2015.

Para estabelecer as concentrações de cada primer (*forward* e *reverse*), foram feitas curvas de “melting” em microplacas MicroAmp Optical de 96 poços, com concentrações que variavam de 50/50nM a 200/200nM. Com as curvas de “melting” os iniciadores foram padronizados nas seguintes concentrações forward (F) e reverse (R) respectivamente: *sipA* 50nM/150nM; *hilA* 150nM/150nM; *invA* 100nM/100nM; 16S-*rRNA* 50nM/200nM.

Dessa forma, o mix da reação foi elaborado conforme os critérios estabelecidos e distribuído em microplacas MicroAmp Optical de 96 poços (Applied Biosystems). O programa utilizado foi: 95°C / 5 minutos; 40 ciclos com 95°C / 30 segundos, 62°C / 45 segundos, 72°C / 45 segundos; extensão final 72°C / 5 minutos.

A fluorescência foi medida após cada anelamento. O gene 16S rRNA tem expressão constitutiva e foi utilizado como controle endógeno. As diferenças entre os níveis de expressão de cada gene da SPI-1 foram determinadas e normalizadas para o 16S rRNA, utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para a quantificação da mudança dos níveis de expressão dos genes, foi efetuada a análise através da expressão dos genes das cepas crescidas de forma planctônica, em comparação com os níveis expressos no cultivo em biofilme, para cada cepa.

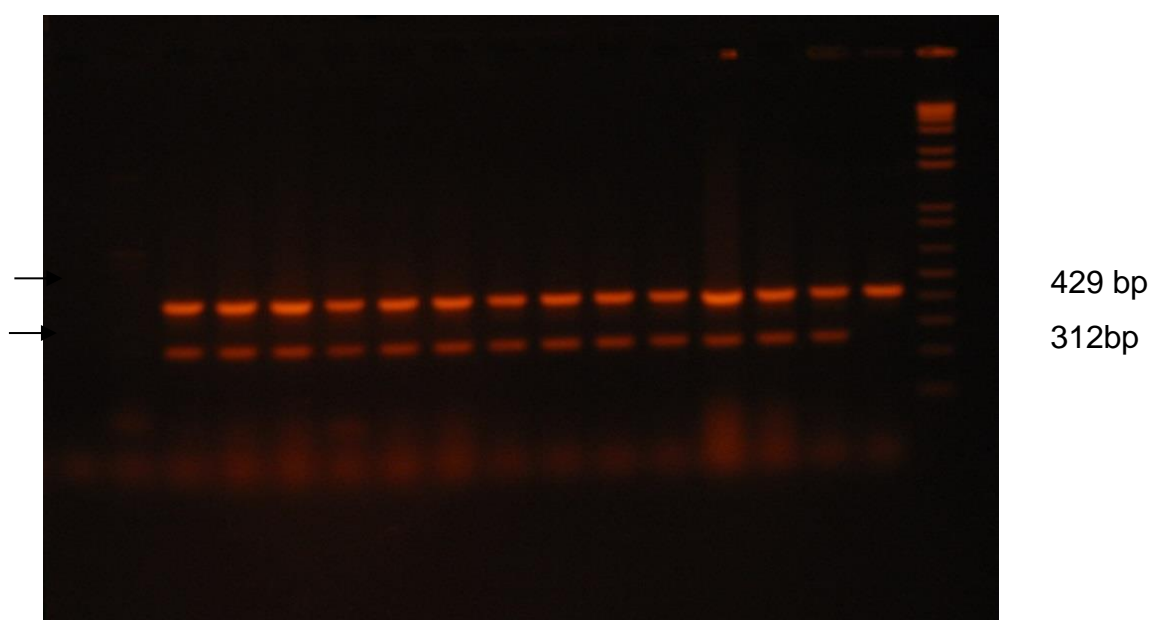
2.11 Estatística

Os resultados nas Tabelas são apresentados como médias \pm SD (“Standard Deviation”). Para comparação dos achados de associação, invasão e expressão gênica entre grupos de cepas, foi utilizado o teste ANOVA Repeated Measures com pós teste de Tukey. As diferenças entre dois resultados foram comparadas com um teste T não pareado, não paramétrico (Mann-Whitney). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Os testes estatísticos foram realizados com o aplicativo GraphPad Prism 5.0.

3 RESULTADOS

Foram confirmadas por PCR todas as amostras de *S. Enteritidis* isoladas nos anos de 2006 a 2010 totalizando 163 amostras. Todas apresentaram resultados positivos para o gene característico do gênero *Salmonella* (sequência randômica cromossômica) e *sefA* (fímbria SEF 14) específico para *S. Enteritidis*, comprovando-se, pelo teste molecular, que toda as cepas estudadas pertencem ao sorotipo Enteritidis (Figura 1).

Figura 1 – PCR para distinção entre *Salmonella* sp. e *S. Enteritidis* utilizando a pesquisa da sequênciã randômica cromossômica (429bp) e do gene *sefA* (312bp), respectivamente



Legenda: Canaletas: 1- água 2- *E.coli* K12 (controle negativo); 3 a 14- cepas identificadas como *S. Enteritidis*; 15- *S. Enteritidis* padrão (cepa ATCC S.64; controle positivo); 16- *S. Typhimurium* padrão (cepa ATCC S.190; controle positivo); 17- Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder). Gel de Agarose (1,5%) em tampão TBE, corado pelo brometo de etídio.

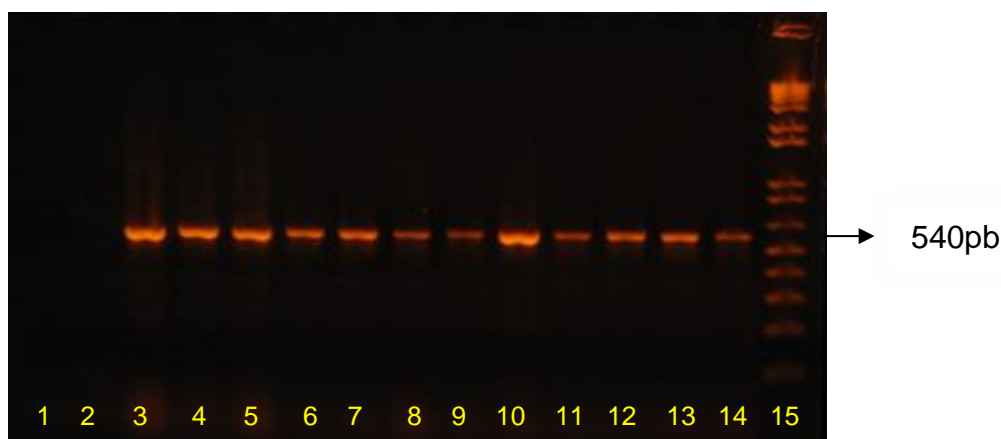
Fonte: Souza, 2015.

Quanto à presença de genes de virulência, foram analisadas por PCR as 163 cepas de *S. Enteritidis*. Os genes analisados foram: SPI-1: *invE/A*, *orgA*, *hilA*, *sipA*; SPI-2: *sseA* e *ssrB*; SPI-3: *mgtC*; SPI-4: *siIE*; SPI-5: *sopB*, e ainda *slyA* que está envolvido na regulação da transcrição, *phoP/Q* que participa do sistema regulatório, *stn* que codifica uma enterotoxina e *spvC* que integra o plasmídeo de virulência da *S. Enteritidis*.

Todas as cepas analisadas foram positivas para os genes de SPI e demais genes cromossômicos investigados. Contudo, encontramos três cepas negativas para

o gene plasmidial *spvC*, sendo duas cepas aviárias (6573 e 11466) e uma cepa humana (12872). Na Figura 2, apresentamos resultado típico da PCR, exemplificado pela pesquisa do gene *orgA*.

Figura 2 – Detecção por PCR do gene *orgA* em cepas de *S. Enteritidis*



Legenda: Canaletas: 1- água; 2- *E.coli* K12 (controle negativo); 3 a 14- cepas positivas para o gene *orgA* (banda com 540 bp); 15- Marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder). Gel de agarose (1,5%) em tampão TBE, corado pelo brometo de etídio.

Fonte: Souza, 2015.

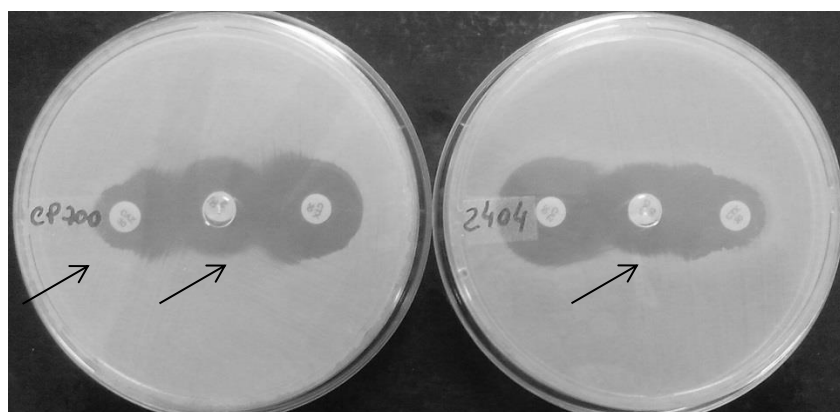
Foram avaliadas no teste de susceptibilidade antimicrobiana, oitenta e cinco cepas isoladas entre 2006 e 2010 (Tabela 3). Destas, 47 (55%), 11 (13%) e 27 (32%) eram respectivamente de origem humana (sangue e fezes), animais (principalmente frango), e de alimentos derivados de aves. Apenas 2,3% das cepas mostrou sensibilidade a todos os antimicrobianos testados. Foram detectados isolados de *S. Enteritidis* resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (MDR) a partir de 2007, e 28% das cepas identificadas em 2009 eram MDR. No geral, 13% das cepas de *S. Enteritidis* (11/85) foram caracterizados como MDR. Na Tabela 4 verifica-se que ocorreram 10 diferentes perfis fenotípicos de MDR. O percentual de ocorrência de cada perfil foi 9,1% exceto para um perfil que apresentou 18,1%. Destaca-se que houve uma maior ocorrência em *S. Enteritidis* de origem humana (81,8%). Apenas as de origem humana e alimentar apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, naquelas de origem animal não foram encontradas MDR.

Nas *S. Enteritidis*, 82% foram resistentes a nitrofurantoína, 91% a quinolona, 54,5% a fluoroquinolonas e antimicrobianos beta-lactâmicos e 36% a

aminoglicosídeos. As estirpes MDR resistentes ao cloranfenicol foram também resistentes à ampicilina e a quinolonas, mas uma cepa resistente ao cloranfenicol foi susceptível à ampicilina e resistente à quinolona. No que diz respeito às quinolonas, verificou-se que 71% (60/85) do total das estirpes examinadas mostraram resistência ao antimicrobiano.

Foram identificadas duas cepas de *S. Enteritidis* produtoras de ESBL (2404/8 e 3305/8), ambas isoladas em 2008 e associadas à infecção humana (gastroenterite e indeterminada (fezes ou sangue) respectivamente), utilizando o método sinérgico de duplo disco (Figura 3).

Figura 3 – Detecção fenotípica das *S. Enteritidis* produtoras de ESBL



Nota: CP700 – Placa de agar Muller Hinton semeada com *Klebsiella pneumoniae* utilizada como controle positivo no teste. 2404/8 – cepa de *S. Enteritidis* positiva para o teste. A cepa controle apresenta aumento do halo de sensibilidade na junção dos halos de CAZ30/AMO+AC.CLAV30 e do halo AMO+AC.CLAV30/CTX30. O mesmo ocorreu para a cepa 2404/8 na junção AMO+AC.CLAV30/CTX30, conforme indicam as setas.

Fonte: Souza, 2015.

Tabela 3 - Perfil de resistência aos antimicrobianos nas cepas de *S. Enteritidis* isoladas entre 2006 e 2010

Ano	Nº. de cepas testadas	Resistência as classes de antimicrobianos: ^(a)					
		0	1	2	3	4	5
2006	7	-	1 (14) ^(b)	6 (86)	-	-	-
2007	18	2 (11)	8 (44)	7 (39)	1 (6)	-	-
2008	14	-	5 (36)	7 (50)	-	2 (14)	-
2009	18	-	-	13 (72)	-	1 (6)	4 (22)
2010	28	-	11 (39)	14 (50)	3 (11)	-	-
Total	85	2 (2,3)^(c)	25 (29)	47 (55)	4 (4,7)	3 (3,5)	4 (4,7)

(a) 0, sensibilidade; 1-5, resistência de 1 a 5 classes de antimicrobianos

(b) nº de cepas (% de cepas do ano indicado)

(c) nº de cepas (% do total de cepas)

Fonte: Souza, 2015.

Tabela 4 - Fenótipos de *S. Enteritidis* com resistência múltipla identificados neste estudo

Fenótipos de Resistência	Fonte de isolamento:			Total
	Animais	Alimento	Humanas	
NAL, NIT, TCY	-	-	1	1 (9,1%)
CHL, NAL, STR	-	-	1	1 (9,1%)
FOS, NAL, NIT	-	1	-	1 (9,1%)
NAL, NIT, STR	-	1	-	1 (9,1%)
CIP, GEN, NAL, NIT	-	-	1	1 (9,1%)
AMP, CEP, CHL, CIP, NIT	-	-	1	1 (9,1%)
AMP, CHL, NAL, NIT, TCY	-	-	1	1 (9,1%)
CEP, CRO, CIP, GEN, NAL	-	-	1	1 (9,1%)
AMP, CEP, CHL, CIP, NAL, NIT	-	-	2	2 (18,1%)
AMP, CEP, CHL, CRO, CIP, NAL, NIT	-	-	1	1 (9,1%)
Total	-	2 (18%)	9 (81,8%)	11 (100%)

MDR: Resistência adquirida a pelo menos um agente em três ou mais classes de antimicrobianos. AMP, ampicilina; CRO, ceftriaxone; CEP, cefalotina; CHL, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; NAL, ácido nalidixico; NIT, nitrofurantoína; FOS, fosfomicina; STR, estreptomicina; TCY, tetraciclina; SXT, trimetoprim-sulfametoxazole.

Fonte: Souza, 2015.

A estirpe 2404/8 foi isolada na região Sudeste do Brasil, no estado de Minas Gerais, e foi resistente à ampicilina, cefalotina, e ceftriaxona, enquanto a cepa 3305/8 foi isolada na região Sul, no estado de Santa Catarina, e mostrou resistência à cefalotina, fluoroquinolona, ceftriaxona, gentamicina e ácido nalidíxico. A análise por PCR identificou o gene que codifica a enzima CTX-M-2 em ambas as estirpes de *S. Enteritidis*.

Todas as 72 estirpes selecionadas para os testes de virulência foram positivas para todos os genes relacionados à virulência, inclusive o gene marcador (spvC) do plasmídio de virulência de *S. Enteritidis*.

Os resultados quanto à produção de biofilme pelas 72 *S. Enteritidis* em estudo, a expressão de curli e celulose e a presença do gene *bap*, relacionado à produção de biofilme em *Salmonella enterica*, bem como a ocorrência de adesinas associadas à virulência, como fímbria tipo 1 e SEF14 (gene *sefA*) e a expressão e atividade dos flagelos, são mostrados na Tabela 5.

Na Tabela 5 verificou-se que a maioria (67%) das *S. Enteritidis* mostrou-se forte produtora de biofilme sendo que 92% delas foram forte ou moderadamente produtoras. O número de estirpes fraco produtoras foi reduzido (8%). Não foi possível correlacionar a produção de biofilme e a fonte de isolamento (sangue ou fezes) nas cepas de origem humana. Contudo, naquelas originárias de fezes, tanto humanas quanto de aves, parece predominar o fenótipo de forte produção de biofilme (85% humanas, 77% aves) (Tabela 5). Tal diferença não foi estatisticamente significativa (Teste T, pareado, $P > 0,05$). Quanto a expressão das adesinas curli e pili tipo 1 (Tabela 5), foi verificado que o percentual de cepas expressando curli é maior entre as aviárias (94%), grupo no qual também foi registrada a maior frequência de cepas forte e moderadamente produtoras de biofilme (31/32 = 97%). Nota-se ainda que a totalidade das *S. Enteritidis* isoladas de fezes de aves, carcaças e ovos apresentaram a expressão curli, o que pode ser uma característica relevante para as cepas aviárias (Tabela 5).

Tabela 5 – Produção de biofilme, presença de adesinas e expressão de celulose e flagelos em 72 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de humanos e de aves no período 2006-2010

Origem	nº de cepas	produção de biofilme ^(a) :			expressão fenotípica:		Adesinas: genes ^(b) :		produção de celulose:	expressão de flagelos ^(c) :
		forte	moderado	fraco	curli	pili tipo 1	<i>bapA</i>	<i>sefA</i>		
<u>Humana:</u>	40	30(75) ^(d)	5 (12,5)	5 (12,5)	29 (72)	24 (60)	40 (100)	40 (100)	30 (75)	40 (100)
fezes	13	11 (85)	-	2 (15)	10 (77)	6 (46)	13 (100)	13 (100)	12 (92)	13 (100)
sangue	18	14 (78)	2 (11)	2 (11)	15 (83)	11 (61)	18 (100)	18 (100)	14 (78)	18 (100)
IND	9	5 (56)	3 (33)	1 (11)	4 (44)	7 (78)	9 (100)	9 (100)	4 (44)	9 (100)
<u>Aves:</u>	32	18 (56)	13 (41)	1 (3)	30 (94)	22 (69)	32 (100)	32 (100)	23 (72)	32 (100)
fezes	13	10 (77)	3 (23)	-	13 (100)	9 (69)	13 (100)	13 (100)	11 (85)	13 (100)
carcaças	5	2 (40)	3 (60)	-	5 (100)	4 (80)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)
ovos	4	1 (25)	2 (50)	1 (25)	4 (100)	2 (50)	4 (100)	4 (100)	3 (75)	4 (100)
IND	10	5 (50)	5 (50)	-	8 (80)	7 (70)	10 (100)	10 (100)	4 (40)	10 (100)
TOTAL	72 (100)	48(67)	18 (25)	6 (8)	59 (82)	46 (64)	72 (100)	72 (100)	53 (74)	72 (100)

IND: indeterminado; ^(a) critério quantitativo segundo Stepanovic *et al.*, 2004; ^(b) pesquisa por PCR; ^(c) avaliação semi-quantitativa da mobilidade em meio semi-sólido (ver Material e Métodos); ^(d) número de cepas (percentual). Fonte: Souza, 2015.

Adicionalmente, ocorreu associação entre os percentuais de estirpes forte e moderadamente produtoras de biofilme e expressão de curli, tanto para as humanas (respectivamente 87,5% e 72%) quanto aviárias (respectivamente 97% e 94%). Tal observação sugere envolvimento de curli na formação de biofilme por *S. Enteritidis*. Contrariamente, não foi detectada associação entre produção de biofilme e expressão de pili tipo 1 (Teste T, pareado, $P > 0,05$).

Ainda na Tabela 5, em relação à produção de celulose e biofilme, verificou-se que nas *S. Enteritidis* humanas e aviárias a frequência de cepas celulose-positivas era praticamente idêntica (respectivamente 75% e 72%), a despeito da diferença verificada nos dois grupos para a forte produção de biofilme (respectivamente 75% e 56%).

Na Tabela 6, foi apresentada a distribuição das 72 estirpes testadas para biofilme em relação à expressão de curli e/ou celulose. Verifica-se que ocorre marcante associação entre a co-expressão daqueles fatores e cepas forte-produtoras de biofilme (40/48, 83%). Já entre as fracamente produtoras de biofilme, a ocorrência concomitante de ambas as adesinas é de apenas 33% (2/6), predominando aquelas que não expressam uma ou ambas as adesinas (4/6, 67%). Aplicando-se o teste de Fisher, foi obtido o valor de $P = 0.002$, altamente significativo, indicando que a ocorrência concomitante das duas adesinas (curli+celulose) associa-se significativamente com cepas forte produtoras de biofilme.

Quanto à origem, 28 *S. Enteritidis* de origem humana e 23 de origem aviária co-expressaram as adesinas, correspondendo respectivamente a 55% (28/51) e 45% (23/51) das cepas curli e celulose positivas.

Tabela 6 - Associação entre expressão de curli e celulose e produção de biofilme por 72 cepas de *S. Enteritidis*

Expressão de Curli e/ou Celulose e número de cepas:	Intensidade de produção de biofilme / origem das cepas:						
	Forte (n=48)		Moderado (n=18)		Fraco (n=6)		
	Humanos	Aves	Humanos	Aves	Humanos	Aves	
Curli e Celulose +	51	25 *	15 *	1	8	2*	-
Curli +, Celulose –	8	1	2	-	4	-	1
Curli -, Celulose +	2	1	-	-	-	1	-
Curli e Celulose –	11	3	1	4	1	2	-
Total	72	30	18	5	13	5	1

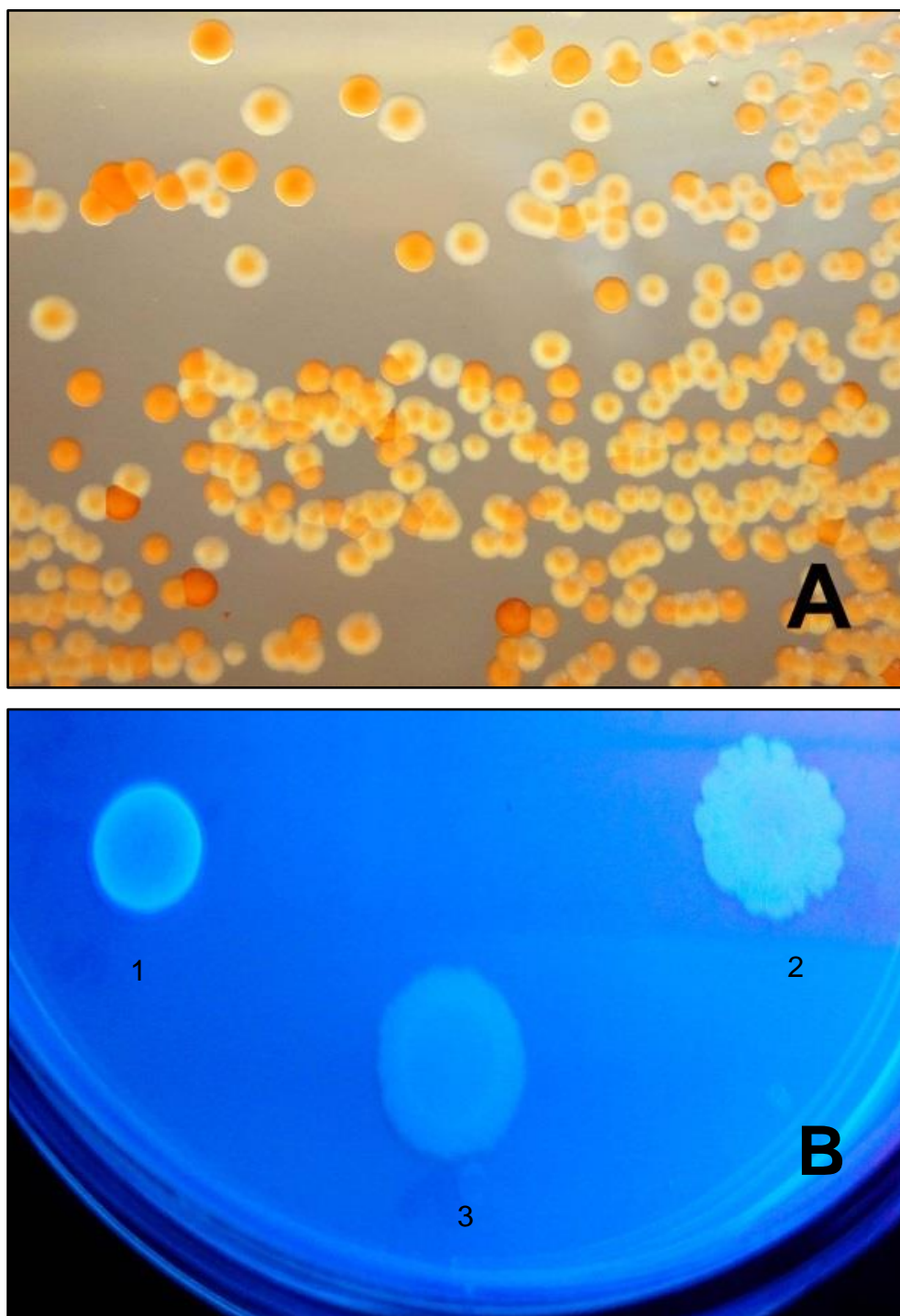
* - Diferença estatisticamente significativa, entre cepas curli e celulose positivas forte e fraco produtoras de biofilme: Teste Fisher ($p=0,002$). (Ver texto).
Fonte: Souza, 2015.

Todas as *S. Enteritidis* carregavam os genes *bapA* e *sefA*, e não foram verificadas diferenças na motilidade, pelo método semi-quantitativo, entre aquelas de diferentes origens ou fenótipos de produção de biofilme.

Na Figura 4, foram apresentadas imagens representativas dos resultados obtidos pelo emprego de meios suplementados com vermelho Congo (Figura 4-A) e calcoflúor (Figura 4-B), utilizados para caracterizar cepas capazes de expressar curli e celulose, respectivamente.

Nota-se na Figura 4-A a presença de colônias vermelhas, indicando a formação de curli pela cepa de *S. Enteritidis*. Colônias que não apresentam coloração são consideradas negativas para a presença de curli. Na Figura 4-B, as cepas positivas para a produção de celulose apresentam fluorescência verde azulada quando expostas à luz UV, enquanto as cepas negativas para celulose mostram-se opacas, sem fluorescência.

Figura 4 – Detecção da presença de curli, em meio com Vermelho Congo e da produção de celulose, em meio com calcoflúor



Legenda: A – Cepa de *S. Enteritidis* apresentando colônias curli-positivas (vermelhas) e curli-negativas (amarelo claro). Figura 4-B – 1 e 2=Cepas de *S. Enteritidis* celulose positivas, apresentando fluorescência verde azulada; 3 – Cepa de *S. Enteritidis* celulose negativa, apresenta-se opaca.

Fonte: Souza, 2015.

Para avaliação da expressão da ilha SPI-1 foram selecionadas 40 cepas dentre as 72 descritas na Tabela 5. Selecionou-se 25 cepas de origem humana (gastroenterite e septicemia), 7 de alimentos derivados de aves e 8 de origem aviária. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Independentemente da sua origem (humanos, alimentos ou aves), os isolados de *S. Enteritidis* mostraram uma grande variação na sua capacidade de aderir e invadir as monocamadas de células Caco-2 polarizadas e diferenciadas (Tabela 7). Em relação à aderência, após três horas de infecção, 44%, 42% e 62%, respectivamente, das estirpes isoladas a partir de seres humanos, alimentos e aves apresentaram índices de associação para os enterócitos iguais ou maiores ($\geq 100\%$) do que o número total de micro-organismos introduzidos com o inóculo inicial (1×10^7 UFC).

Quanto à capacidade de invasão, não foram observadas diferenças significativas entre as cepas dos três grupos ou entre cepas de origem humana provenientes de gastroenterite ou de infecção invasiva. Assumindo o índice 0,5 como um indicador confiável de invasão, confirmou-se que a maioria das *S. Enteritidis* examinadas (35/40; 87,5%) invadem enterócitos humanos, nas condições experimentais adotadas. No entanto, duas estirpes de origem humana (3270/10 e 4719/10) mostraram índices de invasão maiores do que aqueles da cepa controle *S. Typhimurium* C20.

Com o intuito de avaliar o impacto da produção de biofilme na atividade adesiva e invasora do micro-organismo, selecionamos um subconjunto de cepas fortemente produtoras de biofilme. As cepas selecionadas incluíram três cepas humanas, sendo duas de sangue e uma de fezes e ainda três cepas de aves sendo uma de fezes, uma de mecônio e uma de origem indeterminada, sendo que as principais características dessas estirpes estão descritas na Tabela 8.

Tabela 7– Associação e invasão de *S. Enteritidis* a células Caco-2 polarizadas e diferenciadas, após 3 h de infecção
(continua)

Cepas (a)	Origem	Interação com células Caco-2:				Índice de invasão ^(d)
		Contagem Bacteriana (CFU/monocamada) ^(b) Associada	Contagem Bacteriana (CFU/monocamada) ^(b) Intracelular	Número de testes	Índice de associação ^(c)	
<i>S. Enteritidis</i> – infecções humanas						
2/8	fezes	$2,4 \pm 1,0 \times 10^7$	$1,4 \pm 0,5 \times 10^5$	2	240	0,5
5/8	fezes	$1,9 \pm 0,1 \times 10^6$	$4,1 \pm 0,1 \times 10^4$	2	19	2,1
327/10	fezes	$3,3 \pm 1,4 \times 10^6$	$5,3 \pm 0,7 \times 10^4$	2	33	1,6
2404/8	fezes	$1,8 \pm 0,7 \times 10^6$	$9,5 \pm 0,3 \times 10^3$	2	18	0,5
3270/10	fezes	$7,0 \pm 2,6 \times 10^5$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^4$	2	0,7	3,3
3337/8	fezes	$3,4 \pm 1,2 \times 10^7$	$2,4 \pm 0,2 \times 10^5$	2	340	0,7
4647/9	fezes	$1,1 \pm 0,5 \times 10^7$	$6,2 \pm 1,0 \times 10^4$	2	110	0,5
4648/9	fezes	$1,7 \pm 0,1 \times 10^7$	$7,3 \pm 1,0 \times 10^4$	2	117	0,4
8936/8	fezes	$8,6 \pm 0,3 \times 10^5$	$2,2 \pm 0,1 \times 10^4$	2	8,6	2,5
287/8	sangue	$2,8 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,0 \pm 0,5 \times 10^5$	2	280	0,7
667/10	sangue	$2,6 \pm 1,6 \times 10^7$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^6$	2	260	4,6
1899/7	sangue	$1,1 \pm 0,1 \times 10^7$	$7,0 \pm 1,4 \times 10^4$	2	110	0,6
3395/9	sangue	$1,3 \pm 0,5 \times 10^7$	$3,1 \pm 2,4 \times 10^4$	2	130	2,4
4719/10	sangue	$6,0 \pm 0,1 \times 10^5$	$2,7 \pm 0,1 \times 10^4$	2	6,0	4,5
7751/8	sangue	$2,7 \pm 0,8 \times 10^7$	$1,3 \pm 0,6 \times 10^4$	2	270	0,04
8805/10	sangue	$2,7 \pm 0,3 \times 10^6$	$2,2 \pm 0,1 \times 10^4$	2	27	0,8
290/6	indefinida	$1,9 \pm 0,1 \times 10^6$	$3,2 \pm 0,8 \times 10^4$	2	19	1,7
317/7	indefinida	$3,2 \pm 0,4 \times 10^6$	$2,9 \pm 0,2 \times 10^4$	2	32	0,9
495/6	indefinida	$3,4 \pm 0,4 \times 10^6$	$2,7 \pm 0,1 \times 10^4$	2	34	0,8
4524/8	indefinida	$2,9 \pm 0,5 \times 10^7$	$1,1 \pm 0,8 \times 10^5$	2	290	0,4
9360/6	indefinida	$2,7 \pm 0,3 \times 10^6$	$2,7 \pm 0,1 \times 10^4$	2	27	1,0
11477/6	indefinida	$2,0 \pm 0,1 \times 10^4$	$5,6 \pm 0,4 \times 10^2$	2	0,2	2,8
12009/6	indefinida	$4,7 \pm 0,4 \times 10^6$	$2,5 \pm 0,3 \times 10^4$	2	47	0,5

Tabela 7 – Associação e invasão de *S. Enteritidis* a células Caco-2 polarizadas e diferenciadas, após 3 h de infecção (conclusão)

12014/6	indefinida	$1,7 \pm 0,1 \times 10^6$	$5,0 \pm 0,3 \times 10^4$	2	17	2,9
12873/7	indefinida	$1,1 \pm 0,6 \times 10^7$	$5,3 \pm 1,0 \times 10^4$	2	110	0,5
<hr/>						
S. Enteritidis – alimento derivado de aves						
1084/8		$2,8 \pm 0,2 \times 10^7$	$2,8 \pm 0,4 \times 10^5$	2	280	1,0
3230/10		$5,0 \pm 0,7 \times 10^6$	$6,1 \pm 0,3 \times 10^4$	2	50	1,2
5548/7		$2,4 \pm 0,1 \times 10^5$	$1,9 \pm 1,2 \times 10^3$	2	2,4	0,8
9902/10		$1,9 \pm 0,8 \times 10^7$	$2,6 \pm 0,1 \times 10^5$	2	190	1,4
11233/10		$5,0 \pm 0,1 \times 10^6$	$3,5 \pm 1,0 \times 10^4$	2	50	0,7
11466/6		$2,7 \pm 0,3 \times 10^6$	$2,6 \pm 0,1 \times 10^4$	2	27	0,9
17336/9		$3,6 \pm 0,8 \times 10^7$	$2,4 \pm 0,2 \times 10^5$	2	360	0,6
S. Enteritidis – aves						
60/10		$3,3 \pm 0,7 \times 10^6$	$2,3 \pm 0,5 \times 10^4$	2	33	0,7
130/8		$5,0 \pm 0,1 \times 10^6$	$4,1 \pm 0,6 \times 10^4$	2	50	0,8
176/9		$1,2 \pm 0,1 \times 10^7$	$8,3 \pm 2,2 \times 10^4$	2	120	0,7
193/8		$3,6 \pm 0,5 \times 10^7$	$2,9 \pm 0,3 \times 10^5$	2	360	0,8
1224/8		$1,7 \pm 0,2 \times 10^6$	$3,8 \pm 0,8 \times 10^4$	2	17	2,2
2912/7		$3,0 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,9 \pm 0,1 \times 10^5$	3	300	0,6
7666/10		$2,6 \pm 0,7 \times 10^7$	$3,5 \pm 0,6 \times 10^4$	2	260	0,1
10253/6		$2,1 \pm 1,2 \times 10^7$	$6,3 \pm 1,7 \times 10^4$	2	210	0,3
S. Typhimurium						
C-20	Surto de gastroenterite; cepa invasiva	$1,6 \pm 0,1 \times 10^6$	$4,9 \pm 1,0 \times 10^4$	10	16	3,2
<i>Escherichia coli</i>						
C600 (K12)	Cepa laboratorial; controle negativo para o teste de invasão	$2,7 \pm 0,1 \times 10^5$	$7,0 \pm 1,1 \times 10^2$	10	2,7	0,2

(a) todas as cepas de *S. Enteritidis* foram positivas para os 14 genes de virulência testados; (b) média (\pm SD) de 2 ou mais testes independentes, em triplicata; (c) índice de associação: percentagem da relação entre as bactérias associadas. (extracelular+intracelular) e o inoculo original ($1,0 \times 10^7$ UFC); (d) índice de invasão: percentagem da relação entre as bactérias intracelulares (células tratadas c/amicacina) e as bactérias associadas às células. Fonte: Souza, 2015.

Tabela 8 – Principais características de um subconjunto de *S. Enteritidis* fortemente produtoras de biofilme^(a)

Cepas ^(b)	Origem:	expressão fenotípica:		Adesinas: genes ^(c)		produção de:		
		curli	pili tipo 1	<i>bapA</i>	<i>sefA</i>	celulose	flagelos	
<i>S. Enteritidis</i>								
Humanas:								
8064/7	sangue	+	+	+	+	+	+	
1352/8	sangue	-	-	+	+	-	+	
3337/8	fezes	+	-	+	+	+	+	
Aves:								
7666/10	fezes	+	+	+	+	+	+	
10318 /6	IND	-	-	+	+	-	+	
1987/9	mecônio	+	+	+	+	+	+	
<i>S. Typhimurium</i> C20 ^(d)		+	+	+	+	+	+	

IND: indeterminado; ^(a) critério quantitativo segundo Stepanovic *et al.*, 2004; ^(b) todas as cepas foram positivas, por PCR, para um amplo conjunto de genes de virulência: *invEA*, *orgA*, *sipA*, *hilA* (SPI-1), *ssrB*, *sseA* (SPI-2), *mgtC* (SPI-3), *siiE* (SPI-4), *sopB* (SPI-5), *spvC* (plasmídeo pENT), *stn*, *slyA*, *phoP/Q*; ^(c) detectados pela PCR; ^(d) cepa *S. Typhimurium* C20 (controle) foi isolada de um surto hospitalar de gastroenterite.
Fonte: Souza, 2015.

Na Tabela 8, observa-se que uma *S. Enteritidis* humana (8064/7) e uma aviária (7666/10) foram positivas para todas as características pesquisadas, enquanto duas foram negativas para curli, pili tipo 1 e celulose (1352/8 e 10318/6).

Quanto aos genes relacionados à adesina e biofilme, todas as cepas os apresentaram, o que também ocorreu com a produção de flagelo. No caso da produção de celulose uma cepa humana (sangue) e uma cepa de aves (indeterminada) foram negativas.

Para investigação do efeito do cultivo em biofilme na capacidade do micro-organismo associar-se e invadir enterócitos humanos, executaram-se testes quantitativos de invasão com monocamadas polarizadas e diferenciadas de células Caco-2, usando tempo de infecção de 1 hora. Em relação à capacidade de associação, inexistem diferenças significativas resultantes da condição de cultivo para *S. Enteritidis*. No entanto, a *S. Typhimurium* C20 mostrou diferença significativa, associando-se com maior eficiência quando em cultivo planctônico. Ao compararem-se aquelas cultivadas em uma mesma condição (planctônico ou biofilme) verificou-se que *S. Enteritidis* 10318/6 mostrou-se ligeiramente mais eficiente na associação, quando em cultivo planctônico. Não foram detectadas diferenças significativas entre cepas originárias de humanos e aves ou entre os isolados de sangue e fezes (Tabela 9).

No entanto, quanto à invasão verificaram-se diferenças significativas para todas as *S. enterica* analisadas, em função da condição de cultivo. As cepas em cultivo planctônico mostraram-se mais eficientes na capacidade de invadir enterócitos e tal diferença não decorre de uma redução na sua eficiência adesiva, uma vez que não foram verificadas diferenças na capacidade de associação relacionada à condição de cultivo, com exceção da cepa *S. Typhimurium* C20. Ao compararem-se as cepas cultivadas em uma mesma condição, a única diferença significativa corresponde as *S. Enteritidis* 3337/8, 1987/9 e 7666/10, as quais se mostraram mais invasivas do que as demais, quando em cultivo planctônico. Como verificado com a capacidade de associação, também não foram detectadas diferenças na atividade invasora entre as originárias de humanos e aves ou entre os isolados de sangue e fezes.

Para confirmar a atividade invasora das cepas de *Salmonella* executaram-se testes de invasão nas mesmas condições gerais adotadas na Tabela 9, mas empregando monocamadas celulares crescidas sobre lamínulas de vidro. Estas lamínulas foram fixadas e processadas para imunofluorescência, empregando método

diferencial que permite distinguir bactérias extracelulares e intracelulares. Na Figura 5, é possível perceber que a proporção de bactérias intracelulares (marcadas em verde) é maior nas células infectadas por cultivos planctônicos.

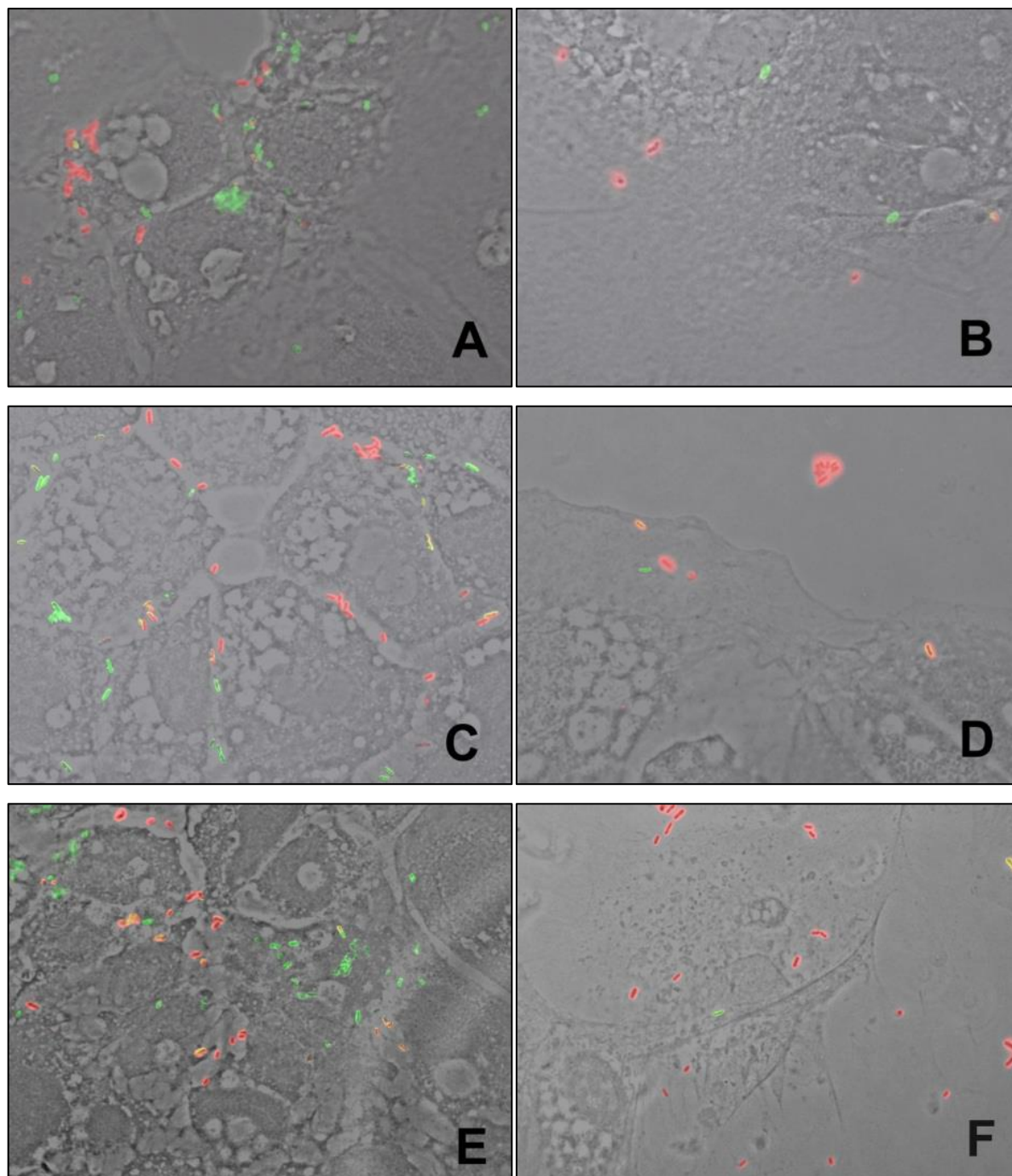
A seguir, avaliou-se a possibilidade que a significativa redução da invasão bacteriana observada com cultivos em biofilme decorra de alguma interferência com os mecanismos de invasão de *Salmonella enterica*. A invasão de células epiteliais pelo micro-organismo é mediada pelos produtos gênicos situados na ilha SPI-1. Em decorrência, no ponto de ligação da bactéria com a membrana celular ocorre intensa mobilização da membrana (“ruffling”), seguindo-se a internalização bacteriana em um vacúolo ou macropinosoma. Executaram-se testes de invasão com cultivos planctônicos e em biofilme, porém empregando tempo de infecção precoce (15 minutos) e marcando por imunofluorescência bactérias e a actina do citoesqueleto (Figura 6). Além disso, utilizaram-se duas linhagens celulares humanas, Caco-2 e HEp-2. Esta última é uma célula que não polariza em cultivo e a sua menor espessura facilita a observação do citoesqueleto. Como esperado, nos pontos de ligação das bactérias de cultivo planctônico, notou-se intensa condensação de actina, reveladora do fenômeno de “ruffling”. Contrastando com esse achado, não foi detectada condensação de actina nos sítios de ligação das bactérias cultivadas em biofilme, sugerindo que esta condição de cultivo efetivamente interfere com a expressão ou funcionalidade dos genes de SPI-1.

Tabela 9 - Interação de cepas de um subconjunto de *S. Enteritidis* fortemente produtoras de biofilme cultivadas em condição planctônica ou em biofilme com células Caco-2 polarizadas e diferenciadas após 1 hora de infecção

Cepas	Bactérias extracelulares + intracelulares:				Bactérias intracelulares:			
	UFC/poço ^(a) e índice de associação ^(b)		índice de associação ^(b)		Bactérias/poço e índice de invasão ^(c)		índice de invasão ^(c)	
	Planctônico	Biofilme	Planctônico	Biofilme	Planctônico	Biofilme	Planctônico	Biofilme
<i>S. Enteritidis</i>								
Humanas:								
8064/7	1,0±0,2 x 10 ⁵	1,0±0,2	2,3±0,5 x 10 ⁵	2,3±0,5	6,0±1,7 x 10 ³	5,7±0,6 (*)	3,0±0,7 x 10 ³	1,1±0,1(*)
1352/8	7,9±1,3 x 10 ⁴	0,7±0,1	5,0±0,5 x 10 ⁴	0,5±0,05	3,5±0,8 x 10 ³	4,6±1,0 (*)	5,0±0,8 x 10 ²	1,2±0,3(*)
3337/8	1,1±0,7 x 10 ⁵	1,1±0,7	2,3±1,9 x 10 ⁵	2,3±1,9	1,6±1,1 x 10 ⁴	13,0±5,9(*)	1,0±0,9 x 10 ³	0,5±0,1(*)
Aves:								
7666/10	2,9±1,4 x 10 ⁵	3,8±1,5	2,3±0,5 x 10 ⁵	2,3±0,5	3,1±0,9 x 10 ⁴	13,1±1,8 (*)	1,4±0,3 x 10 ³	0,6±0,1(*)
10318/6	4,5±1,1 x 10 ⁵	4,5±1,1	3,6±1,1 x 10 ⁵	3,6±1,1	2,4±0,8 x 10 ⁴	6,0±0,8 (*)	1,3±0,5 x 10 ³	0,5±0,1(*)
1987/9	2,2±0,4 x 10 ⁴	0,2±0,04	3,1±1,4 x 10 ⁴	0,3±0,1	3,2±0,6 x 10 ³	15,5±1,7 (*)	1,3±0,5 x 10 ²	3,2±1,8(*)
<i>S. Typhimurium</i>								
C20 ^(d)	5,7±0,7 x 10 ⁴	0,5±0,07 (*)	1,1±0,1 x 10 ³	0,01±0 (*)	2,3±0,5 x 10 ⁴	40,9±5,8 (*)	2,1±0,7 x 10 ²	6,6±4,4(*)

^(a) UFC / poço (monocamada) de células. Os resultados expressam a média ± SD de três experimentos independentes, executados em triplicata; ^(b)índice de associação: (IC+EC)/10⁷ bactérias (inóculo) x 100; ^(c) índice de invasão: IC/(EC+IC) x 100; EC: bactérias extracelulares; IC: bactérias intracelulares; ^(d): cepa controle; (*) diferenças significativas (P<0,05) na associação ou invasão entre cultivos planctônico e de biofilme das cepas indicadas; as diferenças foram analisadas por teste T não pareado, não paramétrico (Mann-Whitney). Fonte: Souza, 2015.

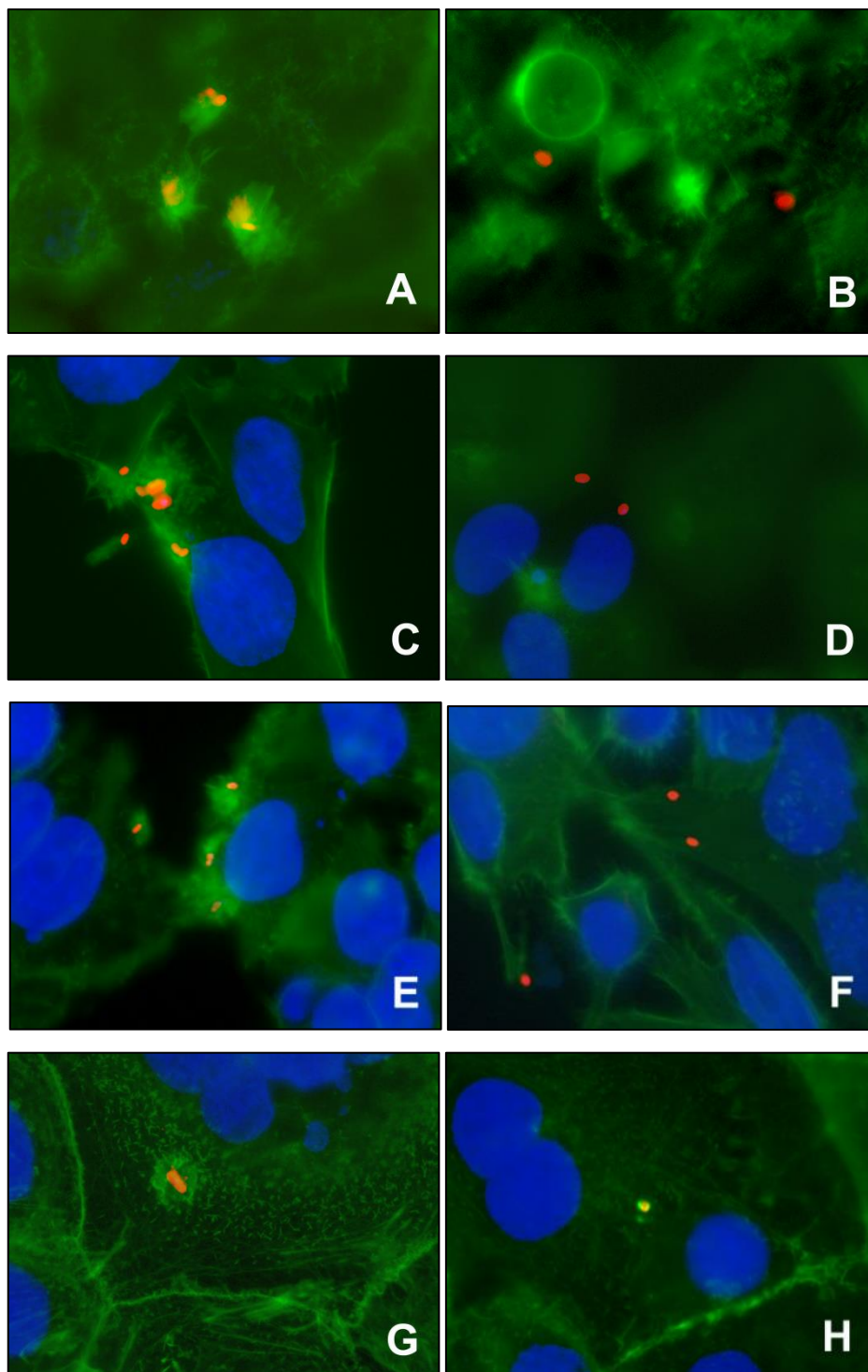
Figura 5 – Atividade invasora de *S. Enteritidis* para células Caco-2 após cultivo em condição planctônica e em biofilme, revelada por imunofluorescência



Legenda: Microscopia de fluorescência com dupla marcação, revelando as bactérias intracelulares (verde) e extracelulares (vermelho). *S. Enteritidis* 10318/6 após cultivo planctônico (A) e biofilme (B). *S. Enteritidis* 1352/8 após cultivo planctônico (C) e biofilme (D). Cepa controle *S. Typhimurium* C-20 após cultivo planctônico (E) e biofilme (F). As imagens consistem na superposição de microscopia de fluorescência com contraste de fase. 1000X.

Fonte: Souza, 2015.

Figura 6 – Mobilização da actina celular por *S. Enteritidis* cultivada em condição planctônica e em biofilme



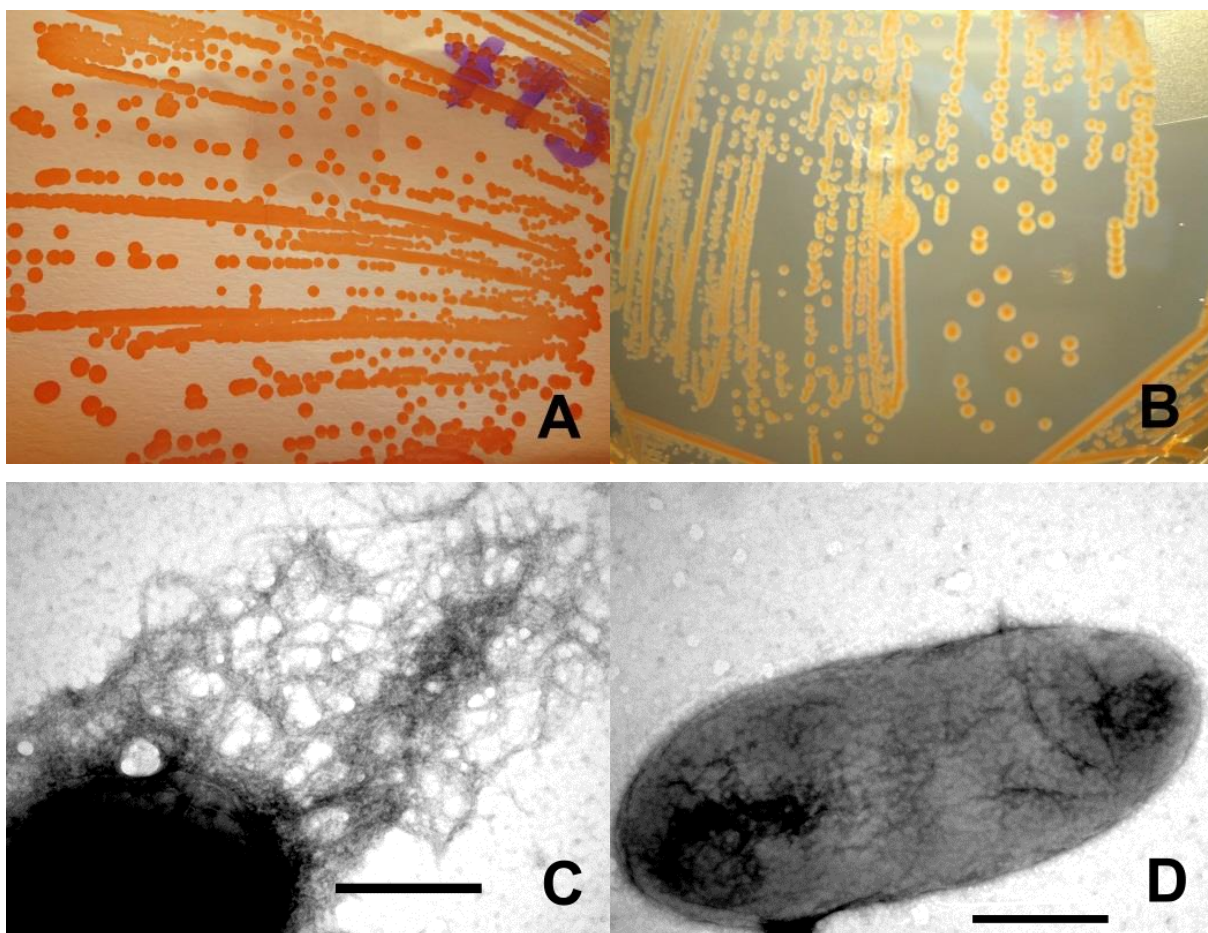
Legenda: Microscopia de fluorescência com dupla marcação, revelando as bactérias associadas as células (vermelho) e a actina do citoesqueleto celular (verde), após 1 hora de infecção de células HEp-2 (A-B-C-D-E-F) e Caco-2 (G-H). *S. Enteritidis* 1352/8 após cultivo planctônico (A, G) e biofilme (B). *S. Enteritidis* 10318/6 após cultivo planctônico (C) e biofilme (D). Cepa controle *S. Typhimurium* C20 após cultivo planctônico (E,H) e biofilme (F). Em algumas imagens, o núcleo das células foi corado com DAPI (azul). 1000X.

Fonte: Souza, 2015.

Foi examinada ainda a possibilidade de a expressão de curli, adesina associada à formação de biofilme em *S. enterica*, pudesse de alguma forma contribuir para a associação ou invasão de enterócitos. Obtiveram-se variantes espontâneas estáveis, produtoras ou não produtoras de curli, das cepas *S. Enteritidis* 10318/6 e 3337/8. O cultivo em meio com vermelho Congo e o exame à microscopia eletrônica confirmaram a estabilidade dos fenótipos positivo ou negativo para curli (Figura 7). Cultivos planctônicos (LBNS, 28°C) das cepas foram então submetidos a testes de invasão quantitativos (Tabela 10). Foram verificadas diferenças de comportamento entre as cepas, com a expressão de curli contribuindo para a associação, mas não para a invasão de enterócitos pela cepa 3337/8. Contudo, para a cepa 10318/6, a expressão de curli não apenas foi ineficiente para promover uma melhor aderência aos enterócitos, mas foi capaz de determinar a redução significativa na sua atividade invasora (Tabela 10).

Diante dos achados sugestivos de que o cultivo em biofilme interfere com a expressão ou funcionalidade de genes situados em SPI-1, foi decidido investigar a expressão de alguns genes essenciais à função daquela ilha de patogenicidade: *sipA*, *invA* e *hilA*. Empregou-se a RT-PCR (qPCR) para avaliar a expressão desses genes nas duas condições de cultivo, em algumas cepas de *S. Enteritidis* (8064/7, 1352/8, 10318/6) e em *S. Typhimurium* C20. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11.

Observe-se que as cepas foram comparadas com elas mesmas, nas duas condições de cultivo, considerando o cultivo planctônico como referência (100% de expressão). De uma maneira geral, verifica-se que o cultivo em biofilme leva a uma importante redução (< 50%) na expressão dos genes investigados. Contudo, o comportamento das várias cepas não foi idêntico, ocorrendo diferentes perfis de redução da expressão genica. As cepas *S. Enteritidis* 1352/8 e 8064/7 e *S. Typhimurium* C20 mostraram redução na expressão dos três genes, enquanto *S. Enteritidis* 10318/6 apenas demonstrou redução importante na expressão do gene *sipA*.

Figura 7 – Expressão de curli por *S. Enteritidis*

Legenda: Imagens de variantes de cepas de *S. Enteritidis* produtoras e não produtoras de curli. Em A e B, fotografias das variantes da cepa 10318/6 cultivadas em meio CFA – vermelho Congo, mostrando colônias vermelhas associadas a expressão de curli (A) e colônias incolores, curli-negativas (B). Em C e D, microfotografias eletrônicas (contrastação negativa) de variantes curli-positivas (C) e curli-negativas (D) da cepa 1352/8.

Fonte: Souza, 2015.

Tabela 10 - Interação de variantes de *S. Enteritidis*, que expressam ou não curli com células Caco-2 polarizadas e diferenciadas, após 1 hora de infecção

Variantes das cepas:	expressão de curli: (a)	Bactérias extracelulares+intracelulares: UFC/poço e índice de associação ^(b)		Bactérias intracelulares: UFC/poço e índice de invasão	
10318/6	positiva	9,3±1,7 x 10 ⁴	0,93	4,4±0,8 x 10 ³ (*)	4,7
	negativa	2,3±0,7 x 10 ⁵	2,3	3,1±0,6 x 10 ⁴ (*)	13,4
3337/8	positiva	2,0±0,9 x 10 ⁶ (*)	20,0	6,2±0,2 x 10 ⁴	3,1
	negativa	1,3±0,3 x 10 ⁴ (*)	0,13	5,6±0,7 x 10 ²	4,3

Legenda: (a) cultivo planctônico em LBNS a 28°C; UFC /poço (monocamada) de células. Os resultados expressam a média ± SD de três experimentos independentes, executados em triplicata; ^(b)índice de associação: (IC+EC)/10⁷ bactérias (inóculo) x 100; ^(c) índice de invasão: IC/(EC+IC) x 100; EC: bactérias extracelulares; IC: bactérias intracelulares; (*) diferenças significativas (P<0,05) na associação ou invasão entre as variantes das cepas de *S. Enteritidis*; as diferenças foram analisadas por teste T não pareado, não paramétrico (Mann-Whitney).

Fonte: Souza, 2015.

Tabela 11 - Expressão de genes da ilha SPI-1 em cepas de *Salmonella* spp. em condições de cultivo planctônico e biofilme

Condições de cultivo/ Cepas	Expressão dos Genes:		
	<i>sipA</i>	<i>hilA</i>	<i>invA</i>
Planctônica:			
Cepas 10318/6, 1352/8, 8064/7, C20	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
Biofilme:			
S. Enteritidis			
10318/6	0,11 (11%)	0,81 (81%)	2 (200%)
1352/8	0,39 (39%)	0,075 (7,5%)	0,047 (4,7%)
8064/7	0,003 (0,3%)	0,008 (0,8%)	-
S. Typhimurium C20	0,44 (44%)	0,27 (27%)	0,046 (4,6%)

A expressão dos genes da ilha SPI-1 e do gene regulador da ilha foi medida por RT-qPCR. Na comparação da expressão da mesma cepa em duas diferentes condições de cultivo, considerada a planctônica como referencia, foi utilizado o gene 16S rRNA para normalização da reação. Os testes de RT-qPCR foram feitos em duplicata.

Fonte: Souza, 2015.

4 DISCUSSÃO

Nas cepas de *S. Enteritidis*, independentemente da origem (humanos, animais ou alimentos) foi identificada a presença de todos os genes cromossômicos de virulência investigados. A ocorrência de genes das SPI 1 a 5, essenciais na invasão e sobrevivência do micro-organismo no hospedeiro, além de genes de adesinas, toxinas e genes reguladores da expressão de fatores de virulência, indica que as cepas encontradas no reservatório animal tem o potencial para causar doença humana. Contudo, no presente trabalho, foi encontrada menor uniformidade em relação aos genes plasmidiais, sendo três cepas negativas (1,8%) para o gene *spvC*. O operon *spv*, situado no megaplasmídeo pENT de *S. Enteritidis*, parece contribuir para a multiplicação intracelular e a fase sistêmica da infecção. Soto *et al.* (2006), avaliando cepas de origem humana, encontraram 5% de *S. Enteritidis* negativas para o gene *spvC* enquanto Castilla *et al.* (2006) relataram a ausência do gene em 7,2% das cepas de origem aviárias que analisaram. Heithoff *et al.* (2008), comparando *S. Typhimurium* isoladas de animais e de doença humana, verificaram que 34% das cepas provenientes de indivíduos com gastroenterite eram destituídas do plasmídeo. Assim, a relevância do plasmídeo de virulência para o desencadeamento da doença humana é questionável, diante da considerável redundância de fatores de virulência codificados no genoma do micro-organismo.

Quanto à resistência aos antimicrobianos, foi observada elevada ocorrência de cepas MDR, compreendendo 28% das estirpes estudadas. Estas vem sendo descrita desde 1960 (ANDERSON, LEWIS, 1965; ROWE *et al.*, 1997) embora inicialmente com uma frequência baixa. No entanto, a partir de 1990 houve um significativo aumento em *S. enterica*, atribuído ao amplo uso de antimicrobianos na medicina humana e veterinária. Tal fato resultou na alteração quanto ao tratamento das salmoneloses com a utilização das fluoroquinolonas e cefalosporina como drogas eletivas (GEBREYER, ALTIER, 2002). No presente estudo, os resultados encontrados apontam maior taxa de MDR para as cepas de origem humana em detrimento daquelas de origem animal, o que pode ser um indicativo da contribuição humana na contaminação alimentos, e a manutenção de surtos com *S. Enteritidis* MDR.

Em *S. Typhimurium* var. Copenhagen foi descrito o perfil de penta-resistência e o mais frequentemente relatado é o fenótipo AmCmStrSuTe. Na última década são crescentes os relatos de ocorrência de *S. enterica* MDR resistentes as fluoroquinolonas (PARRY *et al.*, 2002; POKHARELET *et al.*, 2006). Apesar deste achado, em vários países as cepas de *S. enterica* continuam a apresentar uma boa sensibilidade às fluoroquinolonas (GALES *et al.*, 2002; WAIN *et al.*, 2003; BASNYAT *et al.*, 2005).

Cepas de *S. enterica* resistente às fluoroquinolonas têm sido relatadas em várias regiões (PIDDOCK, 2002; CHEN *et al.*, 2007; CAVACO *et al.*, 2009) e identificadas pelos sistemas nacionais de acompanhamento da França, Inglaterra, País de Gales, Dinamarca e Estados Unidos, apontando o recente surgimento de *S. enterica* MDR com alto grau de resistência à ciprofloxacina (LE HELLO *et al.*, 2011). No presente estudo, 7% das estirpes de *S. Enteritidis* foram resistentes a fluoroquinolonas, um achado preocupante, tendo em conta que o tratamento clínico para a salmonelose sistêmica em seres humanos prioriza esta droga como a primeira escolha em adultos. Além disso, 71% das estirpes incluídas no presente estudo mostraram resistência à quinolona (ácido nalidixico), que está aparentemente relacionada com uma mutação genética que pode favorecer o surgimento de resistência a fluoroquinolonas (GIRAUD, BAUCHERON, CLOECKAERT, 2006), embora atualmente conhece-se a presença de genes plasmidiais (*qnr*). Verificou-se igualmente a resistência à nitrofurantoína (93%), cefalosporinas (6%) e aos aminoglicosídeos (2%). O elevado índice de resistência a cefalosporinas é preocupante, pois o tratamento de salmonelose em crianças é feito com cefalosporinas de terceira geração. As fluoroquinolonas são utilizadas somente para tratamento de adultos. Como atuam sobre as cartilagens, não podem ser usadas em crianças sendo indicadas as cefalosporinas.

Alguns estudos feitos no Brasil encontraram níveis de MDR próximos aos obtidos no presente trabalho, embora divergindo nos perfis de resistência a múltiplas drogas. Costa *et al.* (2013), ao analisarem linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de aves e de alimentos derivados de aves, encontraram 16,4% de estirpes MDR com taxas de resistência às fluoroquinolonas e às cefalosporinas de terceira geração de 0,3% e 5,5%, respectivamente. Medeiros *et al.* (2011) verificaram que 64% das cepas de *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango congeladas eram MDR. Outros autores, ao examinarem cepas isoladas de aves, humanos e alimentos de origem animal,

relataram níveis de ocorrência de MDR entre 8,5% e 19% e taxas de resistência às quinolonas entre 7,7% e 89% (FERNANDES *et al.*, 2003; FONSECA *et al.*, 2006; OLIVEIRA, BRANDELLI, TONDO, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2008; VAZ *et al.* 2010; KOTTWITZ *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011; CAMPIONI, MORATTO BERGAMINI e FALCÃO, 2012; CAMPIONI, ZOLDAN e FALCÃO, 2014; ROWLANDS *et al.*, 2014).

No que se refere à ocorrência de cepas ESBL, duas estirpes de *S. Enteritidis* com este perfil de resistência foram identificadas no presente estudo, ambas carreando genes que codificam a enzima CTX-M, especificamente CTX-M-2. No Brasil, bem como na América do Sul, a ocorrência de ESBL tem sido descrita em Enterobacteriaceae, e as enzimas que pertencem à família CTX-M predominam (SILVA, *et al.*, 2013). As mais frequentes beta-lactamases encontradas são aquelas dos grupos CTX-M-2, CTX-M-8, e CTX-M-9 (BONNET *et al.*, 2000; GARCIA, *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2010; CLÍMACO, MINARINI e COSTA DARINI 2010; QUEIROZ, 2012; SILVA, *et al.*, 2013). Em *S. enterica*, a produção de ESBL foi encontrada em cepas dos sorotipos Agona, Typhimurium, Schwarzengrund e Infantis isoladas de humanos, aves e no ambiente de avicultura (FONSECA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2012; Queiroz, 2012; MULVEY *et al.*, 2004; GELINSKI *et al.*, 2013). No entanto, embora a maioria dos achados seja do grupo CTX-M, Mulvey *et al.* (2004) detectaram o grupo OXA em *S. Agona*, e Queiroz (2012) descreveu a presença do gene *bla_{SHV-5}* em *S. Typhimurium* isolada a partir de fórmula infantil. Tanto quanto sabemos, o presente achado de duas cepas de *S. Enteritidis* isoladas de fonte humana carreando o gene *bla_{CTX-M-2}* constitui o primeiro relato desta ESBL em *S. Enteritidis* no Brasil.

Em relação à interação com células enterocíticas, verificou-se que as cepas de *S. Enteritidis* isoladas de aves e de alimentos de origem aviária são capazes de aderir e invadir enterócitos humanos polarizados e diferenciados, de maneira análoga ao que ocorre com as cepas de origem humana. Em relação a estas, não foram constatadas diferenças que pudessem ser relacionadas à sua origem e cepas isoladas de gastroenterite não foram mais invasoras do que cepas isoladas de doença invasiva. Como em outros estudos (YIM *et al.*, 2010; SHAH *et al.*, 2011a; SHAH *et al.*, 2011b) também foi evidenciada marcante heterogeneidade na atividade invasora para células Caco-2. Shah *et al.* (2011) identificaram entre cepas aviárias variações na invasividade a células Caco-2 polarizadas que correlacionaram com o grau de virulência para modelo *in vivo* (inoculação oral de camundongos). Contudo, os

mesmos autores não obtiveram esta correlação com cepas de origem humana (SHAH *et al.*, 2011b). Yim *et al.* (2010) também verificaram heterogeneidade no comportamento invasivo das cepas testadas, mas contrariamente ao presente trabalho, detectaram maior invasividade entre as cepas isoladas de gastroenterite humana. A invasão de células não fagocitárias por *S. enterica* é um processo complexo, envolvendo múltiplos genes cuja expressão é regulada por diferentes estímulos ambientais e pelo estado de polarização da célula alvo (ALTIER, 2005; GAUTOIS *et al.*, 2006; LORKOWSKI *et al.*, 2014). Portanto, é plausível considerar que as discrepâncias observadas entre os diferentes estudos resultem de limitações inerentes ao próprio modelo de infecção de células *in vitro*.

Investigou-se, através da expressão fenotípica ou da pesquisa de genes por PCR, um leque de adesinas previamente descritas em *S. Enteritidis*. Algumas delas, como o pili tipo 1 (ou SEF21) e o pili LPF (“long polar fimbriae” ou SEF 14), tem sido associadas à virulência do micro-organismo, particularmente a capacidade de mediar a sua interação com células de tecidos do hospedeiro ou linhagens epiteliais humanas (DIBB-FULLER *et al.*, 1999; RANK, SAEED, MURIANA, 2009). A totalidade das cepas que estudamos apresentou o gene *sefA*, que codifica a subunidade estrutural do pili SEF14. A este pili tem sido atribuído papel na virulência para aves (OGUNNIYI *et al.* 1997; EDWARDS, SCHIFFERLI, MALOY, 2000; LOPES *et al.* 2006) a despeito de estudos divergentes (THORNS *et al.*, 1996; ALLEN-VERCOE, WOODWARD, 1999; RAJASHEKARA *et al.* 2000). Quanto ao pili tipo 1 (SEF21), a despeito de termos utilizado metodologia que favorece a sua expressão, entre 30% e 40% das cepas testadas, independente de origem (humana ou aviária), mostraram-se negativas para o pili. O papel de SEF21 nas infecções é também objeto de debate, sendo que alguns o consideram relevante para a interação do micro-organismo com tecidos do trato reprodutivo das aves, resultando na contaminação dos ovos (DE BUCK *et al.*, 2004) enquanto outros não evidenciaram significado patogênico (RAJASHEKARA *et al.*, 2000). Como ressaltam Clayton *et al.* (2008), os resultados contraditórios ou negativos comumente verificados nos estudos sobre o papel destas e de outras adesinas na virulência de *Salmonella enterica* empregando deleções de loci fimbriais, podem apenas refletir a existência de mecanismos compensatórios, onde a deleção de uma fímbria pode modular a expressão de outros pili ou fatores de colonização.

A presença de curli (SEF17) e Bap (gene *bapA*) parecem especialmente relevantes na produção e organização do biofilme (BARNHART, CHAPMAN, 2006; BISWAS *et al.* 2010). Alguns autores atribuem a curli a capacidade de mediar interação e a invasão de células epiteliais (GOPHNA *et al.*, 2001) e favorecer a colonização do intestino das aves (COGAN *et al.* 2004). No presente estudo foram observadas variantes espontâneas curli-positivas e curli-negativas para duas cepas de *S. Enteritidis*. Testada em células Caco-2, uma das variantes curli-positivas demonstrou aumento na aderência as células, sem reflexos na invasividade do micro-organismo. Apesar delas mostrarem estabilidade na expressão da fímbria antes e após a interação com as células, não temos informação sobre a base genética desta variação, a qual poderia afetar a expressão de outros fatores bacterianos envolvidos na interação com as células, mascarando o efetivo papel da fímbria.

A quase totalidade (92%) das cepas de *S. Enteritidis* produziu biofilme forte ou moderado. Esta é influenciada pelas condições de cultura, tipo de superfície e condições de detecção empregadas (STEPANOVIC *et al.* , 2004). Nosso achado é compatível com os valores descritos para sorotipos de *S. enterica*, empregando metodologia quantitativa e condições semelhantes na execução do ensaio (STEPANOVIC *et al.*, 2004; AGARWAL *et al.*, 2011).

Entre os componentes extracelulares dos biofilmes produzidos pela *S. enterica*, foi encontrado curli e celulose, sendo a biossíntese de ambos os produtos acoplada em uma rede regulatória de considerável complexidade (STEENACKERS *et al.*, 2012). Apesar desta co-regulação, verificou-se que a produção de celulose ocorreu em menor frequência (74%) do que a expressão de curli (82%). Solano *et al.* (2002) verificaram percentuais muito semelhantes para a expressão de celulose em *S. Enteritidis*. Aparentemente, a produção de ambos os fatores contribuiria para a formação de biofilmes mais robustos, sendo que curli participa especialmente nas etapas iniciais da formação do biofilme (BARNHART, CHAPMAN, 2006). Neste estudo, confirmou-se a associação entre cepas de *S. Enteritidis* forte produtoras de biofilme e a co-expressão de curli e celulose. Contudo, ao contrário de Römling *et al.* (2003), não foi possível verificar correlação entre cepas de origem humana e a co-expressão daqueles fatores.

A formação de biofilme é importante para a sobrevivência de *Salmonella* spp. em superfícies ambientais e pode ser uma fonte persistente de contaminação (SOLANO *et al.*, 2002). Os micro-organismos residentes nos biofilmes podem resistir

melhor a situações de estresse como dessecação, temperaturas elevadas e a ação de antibióticos e antissépticos. Admite-se que a formação de biofilmes permitiria a sobrevivência por longo período no ambiente das granjas aviárias e a contaminação de carne e ovos, principais veículos em casos de doença humana (JOSEPH *et al.*, 2001).

Contudo, são relativamente poucos os estudos que abordam de forma direta a questão da virulência dos micro-organismos residentes no biofilme. Nesta investigação, verificou-se redução na sua capacidade de invadir células epiteliais humanas, sejam enterócitos (Caco-2) ou células não enterocíticas (HEp-2). Na realização desses ensaios alguns critérios foram estabelecidos, os quais visavam tanto favorecer o estado nutricional das bactérias residentes no biofilme (trocando o meio de cultura 12 horas antes do teste) quanto garantir a sua adequada dispersão, de forma que as suspensões resultantes tivessem populações bacterianas viáveis equivalentes aos controles provenientes de cultivos planctônicos.

A redução na atividade invasora não decorreu de uma limitação ou impedimento da aderência bacteriana. As bactérias residentes no biofilme mostraram-se tão eficientes na associação às membranas celulares quanto os controles planctônicos. A observação microscópica dos tapetes celulares infectados confirmou os achados do teste quantitativo de invasão, ao evidenciar uma importante redução nas bactérias efetivamente situadas no compartimento intracelular. A invasão de células epiteliais por *Salmonella enterica* depende, sobretudo, da atividade dos genes situados na ilha SPI-1, graças a proteínas efetoras translocadas na célula hospedeira por um SST3. Como resultado, ocorre mobilização da actina do citoesqueleto e formação de dobras da membrana (“ruffling”) em torno da bactéria aderida, seguindo-se a sua internalização (RAMOS-MORALES, 2012). A observação feita, no presente estudo, quanto à agregação de actina em torno das bactérias provenientes de biofilme evidenciou uma importante redução na intensidade do “ruffling”, sugerindo disfuncionalidade da ilha SPI-1.

Foi avaliada a expressão de três genes de SPI-1, essenciais à função daquela ilha de patogenicidade: *sipA*, *invA* e *hilA*. SipA é uma proteína efetora que promove a polimerização da actina celular, InvA é uma proteína componente estrutural do SST3 e HilA é a principal proteína reguladora do SST3 da ilha. Quando comparadas bactérias residentes no biofilme e provenientes de cultivo planctônico verificou-se que, exceto para uma das cepas, os três genes sofreram marcante redução na sua

expressão, indicando que a correspondente redução na atividade invasora dos micro-organismos provenientes do biofilme resulta da regulação gênica negativa de um ou mais genes da ilha. Curiosamente, a cepa 10318/6 demonstrou expressão negativa apenas para o gene *sipA*, e em paralelo, um aumento importante da expressão de *invA* e ausência de expressão diferencial para o gene regulador *hilA*. Aparentemente, o decréscimo na expressão de *sipA* é determinante para a redução da atividade invasora do micro-organismo.

Embora tenha-se associado o defeito na atividade invasora à redução na expressão de genes de SPI-1, não foram investigados os mecanismos que levam à regulação negativa da ilha. Tal regulação é reconhecidamente complexa, sendo *hilA* o seu principal regulador transcricional. A atividade invasora é controlada por numerosos circuitos regulatórios, influenciados por sinais genéticos e ambientais e estes tanto podem resultar na ativação de *hilA* quanto na sua repressão.

Sinais ambientais como tensão de O₂, osmolaridade, pH e disponibilidade de nutrientes também influenciam na expressão dos genes de SPI-1 (ALTIER, 2005; IBARRA *et al.*, 2010). Vários desses parâmetros sabidamente sofrem variações em decorrência do crescimento bacteriano em biofilmes (STEENACKERS *et al.*, 2012) e alguns estudos evidenciam que o crescimento em biofilme desencadeia a expressão de certos conjuntos de genes, na sua maior parte associados a respostas ao stress e adaptação fisiológica. Shea *et al.* (2009) verificaram, em *S. Typhimurium*, expressão acentuada de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos, motilidade celular, regulação global e tolerância ao stress, enquanto genes relacionados a virulência tiveram, na sua maioria, importante redução na expressão.

Dentre os genes reguladores que atuam negativamente sobre *hilA*, encontra-se o sistema regulador global PhoP/PhoQ (PEGUES *et al.*, 1995), HilE/HilD e proteínas ligadoras de DNA como Hha e H-NS (SHEA *et al.*, 2009). Tais genes são regulados positivamente nas populações bacterianas residentes em biofilmes (SHEA *et al.*, 2009), o que pode oferecer uma base genética para justificar o decréscimo na redução na expressão dos genes do SST3 de SPI-1 e a redução da atividade invasora para células epiteliais que foram caracterizadas neste trabalho.

CONCLUSÕES

Diante das análises e resultados obtidos, pode-se concluir:

- a) As cepas de *S. Enteritidis* estudadas, independentemente da sua origem, apresentam uma gama de genes cromossômicos e plasmidiais associados à virulência e a maioria das cepas é capaz de associar-se e de invadir enterócitos humanos *in vitro*, demonstrando potencial patogênico entre aquelas circulantes em animais e alimentos desta origem.
- b) Elevada multirresistência antimicrobiana foi observada entre cepas de origem humana, destacando-se as drogas de última geração (fluoroquinolonas e cefalosporinas) empregadas no tratamento empírico da salmonelose.
- c) Pela primeira vez no Brasil, foram identificadas duas cepas *S. Enteritidis* produtoras de ESBL CTX-M-2, ambas provenientes de fonte humana.
- d) A maioria das cepas de *S. Enteritidis* foi forte ou moderada produtora de biofilme, e houve correlação entre a produção de biofilme e co-expressão do pili curli e de celulose, importantes componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella enterica*.
- e) A atividade invasora para células enterocíticas (Caco-2), não apontou diferenças entre cepas isoladas de aves ou alimentos de origem aviária e cepas de origem humana. Considerando a fonte de isolamento não foi possível observar diferença quanto à capacidade de invasão de células enterocíticas (Caco-2) entre isolados de origem sistêmica ou gastroentéricas.
- f) A atividade invasora para células Caco-2 e HEp-2 foi menor em micro-organismos residentes em biofilmes do que aquela demonstrada pela mesma cepa em cultivo planctônico.
- g) Infere-se que a discreta invasão resulta de uma redução na agregação de actina e indução de “ruffling” nos sítios de interação entre bactérias e membrana celular.
- h) Os genes *sipA*, *hilA* e *invA* residentes na ilha SPI-1, associados com a atividade invasora apresentaram redução em sua expressão entre os residentes no biofilme, quando comparados com cultivos em condição planctônica.

REFERÊNCIAS

ABERNATHY, J., *et al.* Deletions in the pyruvate pathway of *Salmonella* Typhimurium alter SPI1-mediated gene expression and infectivity. *J. of Anim. Sc. and Biotechn.*, v.4, n.5, p.1-12, 2013.

- AGARWAL, R.K., *et al.* Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *Internat. F. Res. J.*, v.18, n.4, p.1493-1498, 2011.
- ALLEN-VERCOE, E.; WOODWARD, M.J. Colonisation of the chicken caecum by afimbriate and aflagellate derivatives of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Vet. Microbiol.*, v.69, p.265-275, 1999.
- ALTIER, C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J. Microbiol.*, v.43, p.85-92, 2005.
- ANDRADE, L.N., *et al.* Determinants of beta-lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. *Can. J. Microbiol.*, v.56, p.399-407, 2010.
- BARNHART, M.M.; CHAPMAN, M.R. Curli Biogenesis and Function. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.60, p.131–147, 2006.
- BESSER, T.E. *et al.* Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific Northwest of the United States. *Epidemiol. Infect.*, v.124, p.193–200, 2000.
- BISWAS, R., *et al.* Cloning and sequencing of biofilm-associated protein (*bapA*) gene and its occurrence in different serotypes of *Salmonella*. *Lett. in Appl. Microbiol.*, v.52, p.138–143, 2010.
- BOHEZ, L. *et al.* *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the HilA regulatory protein. *Vet. Microbiol.*, v.116, p.202-210, 2006.
- BOHEZ, L. *et al.* The effect of oral administration of a homologous hilA mutant strain on the long term colonization and transmission of *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens. *Vaccine*, v.26, n.3, p.372-8, Jan 2008.
- BONNET, R., *et al.* A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marscescens* isolated in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.44, p.3061–68, 2000.
- BRENNER, F. W., *et al.* Guest commentary: *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microb.*, v.38, n.7, p.2465–2467, Julho, 2000.
- BUCHMEIER, N. *et al.* A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Molec. Microbiol.*, v.35, n.6, p.1375-1382, 2000.
- CAMPIONI, F., MORATTO BERGAMINI, A.M., FALCÃO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiol.*, v.32, p.254-64, 2012.

CAMPIONI, F., ZOLDAN, M.M., FALCÃO, J.P. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. *Epidemiol. Infect.*, v.142, p.1403-10, 2014.

CASTILLA, K.S. *Detecção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de Salmonella Enteritidis utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR)*. 2003. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CASTILLA, K.S. *et al.* Distribution of virulence genes *sefc*, *pefa* and *spvc* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v.37, p.135-139, 2006.

CAVACO, L.M., *et al.* *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.53, p.603–8, 2009.

CHEN, S., *et al.* Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.51, p.535-42, 2007.

CHUANG Y-C *et al.*, 2008. Identification of the genetic determinants of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium that may regulate the expression of the type 1 fimbriae in response to solid agar and static broth culture conditions. *BMC Microbiol.*, v.8, p.126, 2008.

CLAYTON, D.J., *et al.* Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. *BMC Microb.*, v.8, p.218-228, 2008.

CLÍMACO, E.C., MINARINI, L.A., COSTA DARINI, A.L. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v.68, p.186-9, 2010.

COGAN, T.A., *et al.* Flagella and curli fimbriae are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. *Microbiol.*, v.150, p.1063–1071, 2004.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; Approved Standard- Eighth Edition. CLSI document M100-S25 [ISBN 1-56238-989-0]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2015.

COSTA, R.G., *et al.* Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. *J. Food Prot.*, v.76, p.2011-7, 2013.

COSTA, G. A; HOFER, E. *Isolamento e identificação de Enterobactérias*. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1972.

CORNELIS, G.R.; VAN GIJSEGEM, F. Assembly and function of type III secretory systems. *Ann. Rev. of Microb.*, v.54, p.735-774, 2000.

COWDEN, J.M. *et al.* A national outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 124 caused by contaminated salami sticks. *Epidemiol. Infect.* v.103, p.219–225, 1989.

DALLENNE C., *et al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.65, p.490-5, 2010.

DE BUCK, J., *et al.* Effect of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on bacteraemia and reproductive tract infection in laying hens. *Avian Pathol.* v.33, p.314-320, 2004.

DENG, W. *et al.* Comparative genomic of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J. Bacteriol.* v.185, p.2330–2337, 2003.

DIBB-FULLER, M.P., *et al.* Fimbriae- and flagella-mediated association with and invasion of cultured epithelial cells by *Salmonella* Enteritidis. *Microbiol.*, v.145, p.1023-1031, 1999.

DORAN, J. L. *et al.* DNA-based diagnostic test for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *J. Clin. Microbiol.*, v.31, p.2263-2273, 1993.

DUARTE, D. A. M. *et al.* Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Brazil. J. of Microb.*, v.40, p.569-573, 2009.

EDWARDS, P.R., EWING, W.H. *Identification of Enterobacteriaceae*. 3rd. ed. Burgess Publishing Co., Minnesota. 1986.

EDWARDS, R.A.; SCHIFFERLI, D.M.; MALOY, S.R. A role for *Salmonella* fimbriae in intraperitoneal infections. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.97, p.1258–1262, 2000.

EUZÉBY, J. P. Revised *Salmonella* nomenclature: Designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved Lists 1980), rejection of the name *Salmonella choleraesuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (Approved Lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved Lists 1980). Request for an Opinion. *Internat. J. Syst. Bact.*, v.49, p.927-930, 1999.

EVANS, D.G. & EVANS, D.J.Jr. New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. *Infect. Immun.* v.21, p.638–647, 1978.

EVÊNCIO-LUZ, L.; LIMA-FILHO, J.V.; EVÊNCIO-NETO, J. Occurrence of *Salmonella* sp. and coagulase-positive *Staphylococci* in raw eggs and coalho cheese: comparative study between two cities of Brazil's Northeast. *Brazil. J. of Microb.*, p.1463-1466, 2012.

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium skills to succeed in the host: Virulence and regulation. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.26, n.2, p. 308–341, abr., 2013.

FASS, E.; GROISMAN, E. A. Control of *Salmonella* pathogenicity island-2 gene expression. *Curr. Op. in Microb.*, v.12, n.2, p.199–204, 2009.

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

FERNANDES, S.A. *et al.* *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v.48, p.179-184, 2006.

FERNANDES, S.A., *et al.* CTX-M-2- producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microb. Drug Resist.*, v.15, p.317–21, 2009.

FONSECA, E.L., *et al.* Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.*, v.44, p.2767-72, 2006.

FORSHELL, L. P.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, v.25, p.541-554, 2006.

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, S.A.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and Dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *J. of Food Prot.*, v.12, p.1628-1760, Dec. 2000.

GALÁN, J.E. *Salmonella* interactions with host cells: Type III Secretion at work. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, v.17, p.53–86, 2001.

GALÁN, J. E.; COLLMER, A. Type III Secretion Machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Scien.*, v.284, n.21, p.1322-1328, may 1999.

GAMA, N.M.S.Q.; BERCHIERI, Jr. A.; FERNANDES, S.A. Occurrence of *Salmonella* sp in Laying Hens. Brazil. *J. of Poult. Science*, v.5, n.1, p.15 – 21, Jan - Apr 2003.

GARAI, P.; GNANADHAS, D.P.; CHAKRAVORTTY, D. *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: Revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulen.*, v.3, n.4, p.377–388, July 1, 2012.

GARCIA, D.O., *et al.* Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.52, p.1790–93, 2008.

GELINSKI, J.M., *et al.* Resistance to extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. *Antimicrob. Agent. Chemother.*, v.57, p.3458-59, 2013.

GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect.*, v.8, p.1937-44, 2006.

GLYNN, M. K., *et al.* Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. *The N. Eng. J. of Med.*, v.338, n.19, p.1333-1338, 2011.

GOPHNA, U., *et al.* Curli Fibers Mediate Internalization of *Escherichia coli* by Eukaryotic Cells. *Infect. Immun.* 69:2659–2665, 2001.

GRIMONT, A.D.P., WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. *WHO Collaborat. Cent. for Refer. and Res. on Salmonella*, 9th edition, 2007.

GUERRA, B. *et al.* Molecular characterization of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.190, p.341-347, 2000.

GUIBOURDENCHE, M., *et al.* Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res. Microbiol.*, v.161, p.26–29, 2010.

HACKER, J. *et al.* Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.*, v.23, p.1089-1097, 1997.

HAUTEFORT, I. *et al.* During infection of epithelial cells *Salmonella enterica* serovar Typhimurium undergoes a time-dependent transcriptional adaptation that results in simultaneous expression of three type 3 secretion systems. *Cell. Microbiol.*, v.10, n.4, p.958–984, Apr. 1, 2008.

HENSEL M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.294, p.95–102, 2004.

IBARRA, J.A., *et al.* Induction of *Salmonella* pathogenicity island 1 under different growth conditions can affect *Salmonella*-host cell interactions in vitro. *Microbiol.*, v.156, p.1120-1133, 2010.

JOSEPH, B., *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.*, v.64, p.367–372, 2001.

KIM, S. H.; KIM, Y.H. *Escherichia coli* O157:H7 adherence to Hep-2 cells is implicated with curli expression and outer membrane integrity. *J. Vet. Sci.*, v.5, p.119–124, 2004.

KIMBROUGH, T. G.; MILLER, S. I. Contribution of *Salmonella* Typhimurium type III secretion components to needle complex formation. *Proceed. of the Nat. Acad. of Sci. of the U. S. of Am.*, v.97, n.20, p.11008–11013, 2000.

KISS, T.; MORGAN, E., NAGY, G. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microb. Lett.*, v.275, p.153–159, 2007.

KORHONEN, K.; LEFFLER H.; SVANBORG EDÉN C. Binding specificity of piliated strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium to epithelial cells, *Saccharomyces cerevisiae* cells, and erythrocytes. *Infect. Immun.*, v.32, p.796–804, 1981.

KOTTWITZ, L.B., *et al.* Molecular characterization and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. *J. Med. Microbiol.*, v.60, p.1026-31, 2011.

LÁZARO, N.S. *et al.* *Manual Técnico - Gênero Salmonella: Características Epidemiológicas e Laboratoriais*. Laboratório de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas – Laboratório de Enterobactérias. LRNCEB/LABENT, IOC/VPSRA/FIOCRUZ. Outubro, 2008.

LE HELLO S, *et al.* International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J. Infect. Dis.*, v.204, p.675-84, 2011.

LE MINOR L. e POPOFF, M.Y. Request for an opinion: Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., norn. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Internat. J. Syst. Bact.*, v.37, n.4, p.465-468, out., 1987.

LOPES, V.C., *et al.* Preliminary evaluation of the use of the *sefA* fimbrial gene to elicit immune response against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in chickens. *Avian Dis.*, v.50, p.185–190, 2006.

LURIA, S. E.; BURROWS, J. W. J. *Bacteriol.*, v.471, p.74, 1957.

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

MEDEIROS, M.A.N. *et al.* Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev. Panam. S. Publ.*, v.30, n.6, p.555–60, 2011.

MIRÓ, E., *et al.* Resistencia a quinolonas y betalactâmicos en *Salmonella enterica*, y su relación con mutaciones en las topoisomerasas, alteraciones en la permeabilidad celular y expresión de un mecanismo de expulsión activa. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, v.22, n.4, p.204-211, 2004.

MULVEY, M.R., *et al.* Characterization of a *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type β -lactamase (*bla*OXA-53) and 60 -N-aminoglycoside acetyltransferase genes [*aac*(60)-I30]. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.54, p.354–59, 2004.

OGUNNIYI, A.D., *et al.* Role of SefA subunit protein of SEF14 fimbriae in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect. Immun.*, v.65, p.708–717, 1997.

- OLIVEIRA, S.D. *et al.* Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. *Braz. J. Microbiol.*, v.34, Suppl.1, p.123-124, 2003.
- OLIVEIRA, F.A., BRANDELLI, A., TONDO, E.C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *New Microbiol.*, v.29, p.49-54, 2006.
- PASCHOAL CARDOSO, A. L. S. *et al.* Prevalence of *Salmonella* Enteritidis isolated of drag swabs in poultry houses of broiler chickens. *Rev. Cient. Elet. de Med. Vet.*, v.21, n.20, Periódico Semestral, Jan. 2013.
- PARKHILL, J. *et al.* Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Natur.*, v.413, p.848–852, 2001.
- PEGUES, D.A., *et al.* PhoP/Q transcriptional repression of *Salmonella typhimurium* invasion genes: evidence for a role in protein secretion. *Mol. Microbiol.*, v.17, p.169–181, 1995.
- PÉREZ-PÉREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microb.*, v.40, n.6, p.2153-2162, 2002.
- PERRETT, C.A.; ZHOU, D. *Salmonella* type III effector SopB modulates host cell exocytosis. *Emerg. Microb. and Infect.*, v.2, n.32e, p.2-7, 2013.
- PERSING, D.H. *et al.* *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and Applications*. ASM. Washington, D.C. 1993.
- PETERS, T.M. *et al.* The Salm-gene project – a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Euro. Surveill.*, v.8, p.46-50, 2003.
- PIDDOCK, L.J. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol. Rev.*, v.26, p.3-16, 2002.
- POPPOF, M. Genus III. *Aeromonas* Kluyver and Niel. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v.1, p. 545-548, In: Noel R. Drieg (Ed.) Willians and Wilkins, Baltimore, 1984.
- QUEIROZ, M.L.P. Caracterização de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs), genes de resistência aos antimicrobianos e conteúdo plasmidial em cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. não-tifóides isoladas do ambiente hospitalar e da comunidade. Rio de Janeiro, UERJ, 2012. 119 p. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- RAHN, K. *et al.* Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* Typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molec. and Cell. Prob.*, v.6, p.271-279, 1992.

RAJASHEKARA, G., *et al.* Pathogenic role of SEF14, SEF17, and SEF21 fimbriae in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection of chickens. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.66, p.1759–1763, 2000.

RAWAT, D., NAIR D. Extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. *J Glob Infect Dis.*, v.2, p.263-74, 2010.

RAMOS-MORALES, F. Impact of *Salmonella enterica* Type III Secretion System effectors on the eukaryotic host cell. *Cell Biol.*, Article ID 787934, 36 pages, 2012.

RANK, D.L.; SAEED, A.M.; MURIANA, P.M. Cloning of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis fimbrial protein SefA as a surface protein in *Escherichia coli* confers the ability to attach to eukaryotic cell lines. *Appl. Environm. Microbiol.* v.75, p.6622–6625, 2009.

RIBEIRO, A.R., *et al.* *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. *Braz. J. of Microb.* v.38, p.296-299, 2007.

RIBEIRO, A.R., *et al.* Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.60, p.1259-62, 2008.

RIBEIRO, V.B., *et al.* Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in Multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. *Braz. J. Microbiol.*, v.42, p.685-92, 2011.

RÖMLING, U., *et al.* Multicellular and aggregative behavior of *Salmonella* Typhimurium strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.*, v.28, p.249–264, 1998.

RÖMLING, U., *et al.* Occurrence and regulation of the multicellular morphotype in *Salmonella* serovars important in human disease. *Int. J. Med. Microbiol.*, v.293, p.273–285, 2003.

ROSA, A.C.P., *et al.* Enteropathogenicity markers in *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhoea and healthy in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Microbiol.*, v.47, p.781- 790, 1998.

ROSA A.C.P., *et al.* Interactions of *Escherichia coli* of non-EPEC serogroups that carry *eae* and lack EAF and *stx* gene sequences with undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.200, p.117-22, 2001.

ROWE, B.; WARD, L.R.; THRELFALL, E.J. Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhi: A Worldwide Epidemic. *Clin. Infect. Dis.*, v.24(Suppl 1), p.106-9, 1997.

ROWLANDS, R.E., *et al.* Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.56, p.461-7, 2014.

SALYERS, A.A., WHITT, D.D. *Bacterial pathogenesis: a molecular approach*. 2nd. Ed. ASM Press. Washington, DC. 2002.

SCUR, M.C., *et al.* Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. *Afric. J. of Agricult. Res.*, v.9, n.9, p.823-830, 27 February, 2014.

SILVA E.N; DUARTE A. *Salmonella* Enteritidis in Poultry: Retrospective in Brazil. 2002. *Braz. J. of Poult. Sci.*, v.4, n.2, p.85–100, Mai – Ago, 2002.

SILVA, K.C., *et al.* Emergence of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-2-producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.57, p.3458-9, 2013.

SOLANO, C., *et al.* Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol. Microbiol.*, v.43, p.793–808, 2002.

SOTO, S.M., *et al.* Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *J. Med. Microbiol.*, v.55, p.365-373, 2006.

SOUMET, C.; ERMEL, G.; ROSE, V. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.28, p.113-117, 1999.

STEENACKERS, H., *et al.* *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res. Int.*, v.45, p.502–531, 2012.

STEPANOVIC S., *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. in App. Microb.* v.38, p.428–432, 2004.

TAVECHIO, A.T. *et al.* Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst Med Trop São Paulo*, v.38, n.5, p.315-322, 1996.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.*, v.18, p.426-439, 1997.

TINDALL, B.J., *et al.* Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Internat. J. of System. and Evolut. Microbiol.*, v.55, p.521–524, 2005.

THOMPSON, A., *et al.* *Salmonella* transcriptomics: relating regulons, stimulons and regulatory networks to the process of infection. *Curr. Opin. Microbiol.*, v.9, p.109-116, 2006.

THORNS, C.J., *et al.* Studies into the role of the SEF14 fimbrial antigen in the pathogenesis of *Salmonella enteritidis*. *Microb. Pathog.*, v.20, p.235-246, 1996.

VAZ, C.S., *et al.* Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poult. Sci.*, v.89, p.1530-6, 2010.

VELGE, P., CLOECKAERT, A., BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. *Vet. Research*. v.36, p.267–288, 2005.

VELGE, P., *et al.* Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *Microbiol. Open*, v.1, n.3, p.243–258, 2012.

WHITE, A.P., *et al.* Aggregation via the red, dry, and rough morphotype is not a virulence adaptation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect. Immun.*, v.76, p.1048 –1058, 2008.

APÊNDICE - Formato final do 1^o artigo científico submetido: Virulence genes, enterocyte invasion and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated in Brazil from 2006 through 2010

**Virulence genes, enterocyte invasion and antimicrobial resistance of
Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated in Brazil from 2006 through
2010.**

Rossiane de Moura Souza ^{1,3}; Dália dos Prazeres Rodrigues ² and João Ramos Costa Andrade³

¹ Animal Health Research Center, Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro, Niterói, Rio de Janeiro, Brazil

² National Reference Laboratory for Bacterial Enteroinfections, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

³ Department of Microbiology, Parasitology and Immunology, UERJ, Rio de Janeiro, Brazil

Email: Rossiane de Moura Souza* - rossianesouza@yahoo.com.br; Dália dos Prazeres Rodrigues – dalia@ioc.fiocruz.br; João Ramos Costa Andrade – andrade@uerj.br

* Corresponding author

Abstract

Background: *Salmonella* Enteritidis is a major cause of foodborne diseases worldwide. Poultry is the main reservoir and poultry-derived foods are important sources of human infection. Many chromosomal and plasmid genes are required for virulence, and the invasion of intestinal epithelial cells is considered an essential step to the success of the infection. In Brazil, few studies investigated the occurrence of virulence genes and the cell-invasion ability of *S. Enteritidis*.

Methods: Microorganisms were isolated between 2006 and 2010 from different geographic regions of Brazil from humans, foods and animals. The presence of 14 virulence genes was

tested by PCR, invasion of human intestinal cells (Caco-2) was assessed by a quantitative invasion test and the antimicrobial resistance was evaluated by standardized susceptibility testing.

Results: Of 163 *S. Enteritidis* strains (humans, 55; food, 75; animals, 33) 98% carried all the virulence genes tested (*invE/A*, *orgA*, *hilA*, *sipA*, *sseA*, *ssrB*, *mgtC*, *siiE*, *sopB*, *sefA*, *slyA*, *phoP/Q*, *stn* and *spvC*) and 87.5% of 40 strains (humans, 25; poultry, 8; poultry-derived foods, 7) invaded human enterocytes. Only 2.3% of 85 strains showed susceptibility to all the antimicrobials tested and 71% were resistant to quinolone. Overall, 13% were multi-drug resistant (MDR to ≥ 3 antimicrobial classes), with 82% resistance to nitrofurantoin, 91% to quinolone, 54.5% to fluoroquinolones and beta-lactam antibiotics, and 36% to aminoglycosides. CTX-M-2 ESBL-producing strains were detected in two cases of human gastroenteritis.

Conclusions: Most *S. Enteritidis* strains studied carry a broad array of chromosomal and plasmid virulence genes, and are capable of efficiently adhering to and invading human enterocytes, suggesting a pathogenic potential for the strains circulating in the animal reservoir and in foods of animal origin. It was also found a high frequency of MDR strains, especially among those isolated from humans. The present study also detected significant rates of resistance to quinolones (71%) and to fluoroquinolones (7%), in addition to resistance to cephalosporins (6%) and to aminoglycosides (2%). It also identified, for the first time in Brazil, two ESBL-producing *S. Enteritidis* strains (*bla*_{CTX-M-2} gene), isolated from cases of human disease that were epidemiologically unrelated.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis; virulence genes; cell invasion; antimicrobial resistance; MDR ; ESBL

Background

Salmonella spp. is a major cause of foodborne diseases worldwide [1] with the predominance of ubiquitous serovars, also called zoonotic. Two important changes in the epidemiology of non-typhoid salmonellosis occurred in Europe and the USA in the second half of the 20th century: the emergence of foodborne human diseases caused by *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, serovar Enteritidis (*S. Enteritidis*), and by multi-drug resistant (MDR) *S. enterica* subspecies *enterica*, serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*). In France, in 2001, almost 70% of the human cases were caused by the serovars Enteritidis (33%) and Typhimurium (32%). In the USA, in the same period, the same serovars were prominent (Typhimurium, 22.1% and Enteritidis, 17.7%) [2]. Also, in South America and especially in Brazil, *S. Enteritidis* became one of the most important serovars in human disease - in the last two decades, the number of cases surpassed *S. Typhimurium* as the serovar most frequently involved in human and animal infections [3, 4, 5, 6].

Salmonella spp. carries multiple virulence genes, many of them contained in pathogenicity islands called SPI (*Salmonella* Pathogenicity Island) [7]. Studies reveal that there may be as many as 12 SPI, some of which are conserved within the *Salmonella* genus while others, such as SPI-8, are specific to the serovar *S. Typhi*, and SPI 6, 9, and 10 to subspecies I [2, 8]. However, five SPI occur in *S. enterica*: SPI-1, required for the bacterial invasion in non-phagocytic cells such as those in the intestinal epithelium, SPI-2, SPI-3, and SPI-4, carrying genes required for growth and survival of bacteria in the systemic phase of the disease, and SPI-5, harboring genes involved in the inflammation and in the secretion of chlorides, characterizing the enteric phase of the disease. SPI-1 and SPI-2 carries a dedicated system of protein secretion (type III secretion system; T3SS), responsible for introducing effector molecules in the host cell. The T3SS encoded in SPI-1 (T3SS-1) transfers effector proteins required to the invasion of non-phagocytic cells while the T3SS-2 (SPI-2 island) is necessary for the survival of

Salmonella in macrophages, transferring effector proteins that will disrupt the fusion of lysosomes to the *Salmonella*-containing vacuole [1].

Chromosomal genes not residing in the SPI also participate in the infection. The *slyA* gene activates the expression of the SsrA/B regulatory system, and the expression of the T3SS-2. Genes such as *agfA* and *stn* encodes respectively the thin aggregative fimbriae and an enterotoxin [9, 10]. The *phoP/Q* chromosomal genes constitute a negative regulatory system of the SPI-1. They also positively regulate the activation of the SPI-2 genes. The negative regulation of the T3SS-1 by *phoP/Q* stems from repressing the expression of the *hilA* in response to low intracellular concentration of Mg⁺⁺ in the macrophages [11]. Many *S. enterica* serovars harbor virulence plasmids. They all share a highly conserved region of 8 Kb, with five genes designated as *spvRABCD*. The *spv* region seems to promote active growth and survival of *S. enterica* inside the host cells, being relevant to the systemic infection in experimental animals [9].

In Brazil, few studies have investigated the occurrence of virulence genes in strains of *S. Enteritidis*. Castilla et al. [12] searched for *sefC*, *pefA*, and *spvC* in phage type 4 avian strains, Oliveira et al. [13] evaluated the occurrence of *invA*, *spvR*, and *spvC* in isolates from various sources, and Campioni et al. [14,15] searched for 13 virulence genes in isolates from birds, humans, and foods.

The ability of *Salmonella* spp. to invade intestinal epithelial cells is considered an essential step to the success of the infection [7] and some studies suggest that *S. Enteritidis* isolated from animals and from human infections vary in their pathogenic potential and the invasiveness to intestinal cells may be associated with such differences [16,17,18].

Bacterial resistance to antimicrobials constitutes a serious public health issue and the utilisation of antimicrobials in veterinary medicine and in the growth promotion of farm animals has aggravated this situation [19]. Due to the increasing resistance of *Salmonella* spp. to

antimicrobials such as ampicillin, chloramphenicol, and trimethoprim-sulfamethoxazole [7,20], fluoroquinolones and third-generation cephalosporins have been recommended as first-line drugs for the treatment of invasive disease. However, a growing increase in resistance to these agents and the appearance of strains producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) has been verified [20,21].

As for the resistance to antimicrobial agents in *S. Enteritidis* isolated in our country, several studies have been made over the past decade [4, 6, 14,15, 22, 23, 24, 25, 26, 27]. In general, the significant occurrence of MDR strains in isolates from animals as well as from human infection has been confirmed.

Brazil is one of the three main poultry producers in the world and the largest exporter of poultry meat, having exported 3.9 million tons in 2011 (Ministry of Agriculture: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves> Accessed on July 7, 2015). Poultry constitutes the main reservoir of *S. Enteritidis* and poultry-derived products such as meat and eggs are considered the most important sources of human infection. Due to the elevated prevalence of *S. Enteritidis* and the scarcity of studies about its pathogenicity in Brazil, a set of strains isolated between 2006 and 2010 from humans, animals, and foods of animal origin were evaluated for the presence of a range of virulence genes, their invasive activity to human intestinal cells (Caco-2), and their antimicrobial resistance profile.

Methods

Bacterial strains and growth conditions

For the study, 163 strains of *S. Enteritidis* were selected. All strains were isolated between 2006 and 2010 in different geographic regions of Brazil from humans (stool,16; blood, 19; unknown, 20), food (poultry-derived, 39; raw or cooked beef, 31; unknown, 5) and animals (poultry, 23; cattle, 10) (Table 1). Most strains were isolates without any known epidemiological linkage

(sporadic isolates). Fewer isolates were outbreak strains, and only a single isolate from any outbreak was selected for this study. The strains had been isolated at the Public Health laboratory network from the Ministry of Health, by accredited laboratories from the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply or by laboratories of research institutes and Universities. All strains were identified by standard biochemical tests and serotyping at the National Reference Laboratory for Enteric Disease (Oswaldo Cruz Foundation, RJ, Brazil). All strains were also evaluated by PCR for gene sequences specific for *Salmonella* spp. and *S. Enteritidis* (*sefA*), as described by Soumet et al. [28]. The strains were kept into Buffered Nutrient Agar at room temperature. Working cultures were kept on GC-Broth (Difco) containing 20% glycerol at -80°C. For cultivation of the bacteria, one loopful of the frozen *Salmonella* suspension was inoculated into 5 ml Luria broth (LB) or Tryptic soy broth (TSB) and incubated at 37°C for 12–18 h.

DNA extraction and PCR amplification of virulence genes

S. Enteritidis strains were cultured overnight at 37°C on Mueller-Hinton (MH) agar plates. A loopful of each culture was suspended in 1mL distilled water. For DNA extraction, cell suspensions were heated to 100°C for 10 min and then immediately cooled on ice for 5 min. Cell suspensions were centrifuged (14,000 g, 1 min), and supernatants used as the DNA template for PCR amplification. All the *S. Enteritidis* isolates were screened for 14 virulence genes, including *sefA* [28], *invE/A*, *slyA*, *phoP/Q* [29], *hila*, *sipA*, *sopB* [30], *mgtC*, *stn*, *spvC*, *orgA* [9], *sseA*, *sseB* [31] and *siiE* [32]. Single and multiplex PCR reactions were carried out using the primer-pair combinations, reagent concentrations and PCR cycling conditions as described in the above studies. Aliquots (15 µL) of the amplification products were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gels using TBE (Tris-borate/ EDTA) as running buffer. Gels were stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) and visualized with UV light.

Escherichia coli DH5 α (K12) and prototypical *S. Enteritidis* ATCC S.64 and *S. Typhimurium* ATCC S.190 strains were used as controls in every PCR procedure.

Cell culture

The human intestinal epithelial cell line Caco-2 (ATCC HTB 37; colon adenocarcinoma) was grown in D-MEM medium (Sigma) supplemented with 1% non-aminoacids mixture (Invitrogen), 4mM L-glutamine (Invitrogen), 10% fetal bovine serum (Gibco) and antibiotics (50 μ g/mL gentamicin; 2.5 μ g/mL fungizone). Cells were cultured in flasks or 24-well plates (TPP) in a humidified incubator under 5% CO₂/95% air at 37°C.

Quantitative invasion assay

Polarized Caco-2 monolayers grown for 12 days in 24-well plates were used for comparing invasiveness between 40 *S. Enteritidis* strains (human, 25; poultry products, 7; chicken, 8). For each group, the strains were chosen at random. Bacterial invasion was measured as protection against amikacin killing [33]. Briefly, the cell monolayers were washed with PBS and covered with 1 ml of fresh medium containing D-mannose 1%. Approximately 1.0×10^7 bacteria were loaded into the cell culture monolayers and incubated at 37°C for 2 h in 5% CO₂/95% air. The monolayers were thoroughly washed with PBS and then incubated for another 1 h in a fresh medium containing 100 μ g/mL amikacin to kill extracellular bacteria. Control monolayers were incubated with medium without amikacin. After incubation, monolayers were washed with PBS and then lysed with a 1% Triton X-100 solution. Appropriate dilutions were spread onto TSA plates, incubated at 37°C overnight, and colony-forming units (CFU) were counted. The percentage invasion was calculated by dividing the number of surviving (intracellular) bacteria by the number of bacteria in the controls (cell-associated bacteria). Experiments were run in triplicate and repeated at least two times. All strains tested were found to be susceptible to

amikacin. Bacterial viability was unaffected after incubation (1 h at 37°C) with 1% Triton X-100. *S. Typhimurium* C20 and *E. coli* C600 (K12) were used as positive and negative controls respectively. The data were analyzed by the unpaired, two-tailed t test. Statistical test with the result of $P < 0.05$ was considered to be significant.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute [34]. The antimicrobial susceptibility of 85 *S. Enteritidis* strains was tested for 12 antimicrobials using commercially available discs (Oxoid). The antimicrobials tested and the disk potency used were as follows: Ampicillin (AMP; 10 µg), Ceftriaxone (CRO, 30 µg), Cephalothin (CEP, 30 µg), Chloramphenicol (CHL, 30 µg), Ciprofloxacin (CIP, 5 µg), Gentamicin (GEN, 10 µg), Nalidixic Acid (NAL, 30 µg), Nitrofurantoin (NIT, 300 µg), Phosphomycin (FOS, 200 µg), Streptomycin (STR, 10 µg), Tetracycline (TCY, 30 µg) and Trimethoprim-Sulfamethoxazole (SXT, 23.75/1.25 µg). Isolates were categorized as susceptible or resistant, according to the guidelines of the CLSI [34]. *E. coli* (ATCC 25922) was used to assure control and reliability in the results.

Phenotypic detection of ESBL-producing isolates

Isolates were screened for ESBL production by using a double-disk synergy test [35]. Mueller-Hinton agar was inoculated, and disks containing the standard 30-µg quantities of ceftazidime and cefotaxime were placed 30 mm (center-to-center) from an amoxicillin-clavulanic acid (20 and 10 µg, respectively) disk. After plates were incubated for 18-20 hours at 37°C, the appearance of an enhanced zone of inhibition between any one of the β-lactam disks and the amoxicillin-clavulanic acid disk was interpreted as presumptive evidence of the presence of an

ESBL. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *E. coli* ATCC 25922 were used as positive and negative controls respectively.

PCR amplification of ESBL genes

In order to detect beta-lactamases, PCR assays were performed to assess the presence of the *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{OXA} genes, using the primers, amplification reagent concentrations and PCR cycling conditions described by Dallenne et al [36].

Results

Virulence genes in *S. Enteritidis*

Almost all strains carried the 14 virulence genes searched (*invE/A*, *orgA*, *hilA*, *sipA* (SPI-1); *sseA* and *ssrB* (SPI-2); *mgtC* (SPI-3); *siiE* (SPI-4); *sopB* (SPI-5), *sefA*, *slyA*, *phoP/Q*, *stn*, and *spvC*. However, three strains were negative for the *spvC* plasmid gene: two avian strains (6573/10 and 11466/6) and one human strain (12872/7).

Adherence to and invasion of polarized Caco-2 cells

Regardless of their origin (human, foods or birds), *S. Enteritidis* strains showed a wide variation in their ability to adhere to and to invade the differentiated and polarized monolayers of Caco-2 cells (Table 2). Regarding their adhesion, after three hours of infection, 44%, 42%, and 62%, respectively, of the strains isolated from humans, foods, and birds showed association indices for the enterocytes equal to or greater than the total number of microorganisms introduced with the initial inoculum ($\geq 100\%$). As for invasiveness, no significant differences were observed between the strains from the three groups or between human origin strains isolated from gastroenteritis or from invasive infection. Assuming the value of 0.5 as a reliable indicator of invasion, it was confirmed that most *S. Enteritidis* (35/40; 87.5%) invaded human enterocytes under the experimental conditions adopted. However, only two strains from human origin

(3270/10 and 4719/10) showed invasion indices greater than those of the *S. Typhimurium* control strain.

Antimicrobial resistance profiles

Eighty-five strains isolated between 2006 and 2010 were evaluated. Of those, 47(55%), 11(13%), and 27 (32%) were of human origin (blood and stool), from animals (mostly chicken), and from poultry-derived foods. Only 2.3% of the strains showed susceptibility to all the antimicrobials tested. *S. Enteritidis* strains resistant to three or more classes of antimicrobials (MDR) were detected since 2007, and 27.7% of MDR strains were identified in 2009. Overall, 13% of the *S. Enteritidis* strains (11/85) were characterized as MDR. Of those, 82% were found to be resistant to nitrofurantoin, 91% to quinolone, 54.5% to fluoroquinolones and beta-lactam antimicrobials, and 36% to aminoglycosides (Table 3). The chloramphenicol-resistant MDR strains were also resistant to ampicillin and to quinolones, but one chloramphenicol-resistant MD strain was found to be susceptible to ampicillin and resistant to quinolone. In regard to quinolones, it was found that 71% (60/85) of the total strains examined showed resistance to the antimicrobial.

Two ESBL-producing *S. Enteritidis* strains (2404/8 and 3305/8), both isolated in 2008 and associated with human infection (gastroenteritis), were detected. The 2404/8 strain was isolated in the southeastern region of Brazil, in the state of Minas Gerais, and it was resistant to ampicillin, cephalotin, and ceftriaxone. The 3305/8 strain was isolated in the southern region, in the state of Santa Catarina, and showed resistance to cephalotin, fluoroquinolone, ceftriaxone, gentamicin, and nalidixic acid. Analysis by PCR identified the gene that encodes the CTX-M-2 enzyme in both *S. Enteritidis* strains.

Discussion

In the *S. Enteritidis* strains evaluated, regardless of their origin (human, animal, or food) all the investigated chromosomal virulence genes were detected. The occurrence of genes from SPI-1 to SPI-5, required to the invasion and survival of the microorganism inside the host, and adhesin genes, toxins, and genes that regulate the expression of virulence factors, indicates that the strains found in the animal reservoir have the potential to cause human disease. However, less uniformity was found in relation to the plasmid genes, and three strains were negative for the *spvC* gene. The *spv* operon seems to contribute to the intracellular multiplication and to the systemic phase of the infection. Soto et al. [9] found 5% of the *S. Enteritidis* strains negative for the *spvC* gene, while Castilla et al. [12] reported its absence in 7.2%. Heithoff et al. [37], while comparing *S. Typhimurium* of animal and human origins, verified that 34% of the strains isolated from individuals with gastroenteritis were devoid of the plasmid. Thus, the relevance of the virulence plasmid of *S. enterica* to the triggering of human disease is questionable, due to the redundance of virulence factors encoded in the microorganism's genome.

Concerning the interaction with enterocytic cells, it was found that *S. Enteritidis* isolated from poultry-associated foods and from chicken are capable of adhering and invading polarized and differentiated human enterocytes, analogous to what occurs with human origin isolates. As for human strains, no differences were observed between strains isolated from gastroenteritis or from invasive disease. Such as in other studies [17, 18, 38], it was found a distinct heterogeneity in the invasive activity for the Caco-2 cells. Shah et al [17] identified variations among avian *S. Enteritidis* strains in the invasion of polarized Caco-2 cells that correlated with the degree of virulence for the *in vivo* model (orally infected mice). However, those authors could not obtain the same correlation with human origin strains [18]. Yim et al [38] also verified heterogeneity in the invasive behavior of the strains tested, but contrary to the present study, they detected higher invasiveness among the strains isolated from human gastroenteritis. The invasion of non-phagocytic cells by *S. enterica* is a complex process that involves multiple

genes, whose expression is regulated by different environmental stimuli and by the state of polarization of the host cell [7, 39, 40]. Therefore, it is plausible to consider that the discrepancies observed between this and the other studies result from limitations inherent to the *in vitro* cell infection model itself.

Concerning the antimicrobial resistance, a high occurrence of MDR strains was observed, including 28% of the strains studied. The raising of MDR strains has been described since 1960, although initially with low frequency. Nevertheless, since 1990, there has been a significant increase in the incidence of MDR in *S. enterica*, attributed to the wide use of antimicrobials in human and veterinary medicine. With the appearance of MDR, the treatment of salmonellosis has been re-evaluated, with the fluoroquinolones becoming the drugs of choice.

Strains of *S. enterica* resistant to fluoroquinolones have been reported in several regions [41, 42, 43] and identified by the national monitoring systems of France, England, Wales, Denmark, and the United States, disclosing the recent emergence of MDR *S. enterica* with high degree of resistance to ciprofloxacin [44]. In the present study, 7% of the *S. Enteritidis* strains were resistant to fluoroquinolones, a worrisome finding in view of the clinical treatment for systemic salmonellosis in humans prioritizing this drug as the first choice. Beyond that, 71% of the strains included in the present study showed resistance to quinolone, which is apparently related to a genetic mutation that may favor the appearance of resistance to fluoroquinolones [45]. It was also found resistance to nitrofurantoin (93%), cephalosporin (6%) and to aminoglycosides (2%).

A few studies made in Brazil found MDR levels close to those obtained in the present study, although diverging in the multi-drug resistance profiles. Costa et al [25], while examining *S. Enteritidis* strains isolated from poultry and poultry-derived foods, found 16.4% of MDR strains with resistance rates to fluoroquinolones and to third-generation cephalosporins of 0.3%

and 5.5%, respectively. Medeiros et al [6] found that 64% of the *S. Enteritidis* strains isolated from frozen chicken carcasses were MDR. Other authors, while examining strains isolated from birds, humans, and foods of animal origin, reported occurrence levels of MDR between 8.5% and 19% and resistance rates to quinolones between 7.7% and 89% [4, 14, 15, 22, 23, 24, 26, 27, 46, 47, 48].

Concerning the occurrence of ESBL strains, two *S. Enteritidis* strains with this resistance profile were identified in the present study, and both carried genes encoding the CTX-M enzyme, specifically CTX-M-2. In Brazil, as well as in South America, the occurrence of ESBL has been described in *Enterobacteriaceae*, and the enzymes belonging to the CTX-M family predominate [49]. The most frequent beta-lactamases are those in the groups CTX-M-2, CTX-M-8, and CTX-M-9 [49, 50, 51, 52, 53, 54, 55]. In *S. enterica*, ESBL was found in strains of the Agona, Typhimurium, Schwarzengrund and Infantis serovars isolated from humans, poultry and poultry farming environment [46, 49, 52, 55, 56, 57]. However, although most findings are from the CTX-M group, Mulvey et al [56] detected the OXA group in *S. Agona*, and Queiroz [55] described the presence of the *bla*_{SHV-5} gene in *S. Typhimurium* isolated from infant formula. As far as we know, the present finding of two *S. Enteritidis* strains isolated from human disease carrying the *bla*_{CTX-M-2} gene constitutes the first report of this ESBL in *S. Enteritidis* in Brazil.

Conclusions

This work has confirmed that the *S. Enteritidis* strains studied, regardless of their origin, carry a broad array of chromosomal and plasmid virulence genes, with most of the strains capable of efficiently adhering to and invading human enterocytes, which together suggest a significant pathogenic potential for the strains circulating in the animal reservoir and in foods of animal origin. It was also found a high frequency of MDR strains, especially among those isolated

from humans. The present study also detected significant rates of resistance to quinolones (71%) and to fluoroquinolones (7%), in addition to resistance to cephalosporins (6%) and to aminoglycosides (2%). It also identified, for the first time in Brazil, two ESBL-producing *S. Enteritidis* strains (*bla*_{CTX-M-2} gene), isolated from cases of human disease that were epidemiologically unrelated.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

RMS carried out phenotypic and molecular tests, analysed the data and wrote the manuscript. DPR granted full access to the bacterial strains, participated in the analysis of data and reviewed the manuscript. JRCA designed the study, analysed the data and reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

This work was partly supported by FAPERJ and CNPq. We thank Maria Angelica P. da Silva, Thays A. Gonçalves and Raquel C. L. Rebello for their technical assistance and Mara Lúcia P. Queiroz (UERJ) for helpful advice in the identification of ESBL-producing strains.

References

1. Ramos-Morales F. Review Article - Impact of *Salmonella enterica* type III secretion system effectors on the eukaryotic host cell. ISRN Cell Biol. 2012; 2012:787934, <http://dx.doi.org/10.5402/2012/787934>
2. Velge P, Cloeckaert A, Barrow P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. Vet Res. 2005; 36: 267-88.
3. Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1996; 38:315-22.
4. Fernandes SA, Ghilardi AC, Tavechio AT, Machado, AM, Pignatari AC. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003; 45:59-63.
5. Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Bessa MC, Nascimento VP. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolates. Braz J Microbiol. 2007; 38:296-9.
6. Medeiros MAN, Oliveira DCN, Rodrigues DP, Freitas DRC. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. Rev Panam Salud Publica. 2011; 30:555–60.

7. Altier C. Genetic and environmental control of *Salmonella* invasion. *J Microbiol.* 2005; 43:85-92.
8. Hensel M: Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *Int J Med Microbiol.* 2004; 294: 95–102.
9. Soto SM, Rodriguez I, Rodicio RM, Vila J, Mendoza C. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. *J Med Microbiol.* 2006; 55: 365-73.
10. Thompson A, Rowley G, Alston M, Danino V, Hinton JCD. *Salmonella* transcriptomics: relating regulons, stimulons and regulatory networks to the process of infection. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9:109-16.
11. Bohez L, Dewulf J, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Van Immerseel F. The effect of oral administration of a homologous *hilA* mutant strain on the long term colonization and transmission of *Salmonella* Enteritidis in broiler chickens. *Vaccine.* 2008; 26:372-8.
12. Castilla KS, Ferreira CSA, Moreno CSA, Nunes IA, Ferreira AJP. Distribution of virulence genes *sefC*, *pefA* and *spvC* in *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains isolated in Brazil. *Braz J Microbiol.* 2006; 37:135-9.

13. Oliveira SD, Rodenbusch CR, Michael GB, Cardoso MIR, Canal CW, Brandelli A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. *Braz J Microbiol.* 2003; 34:123-4.
14. Campioni F, Moratto Bergamini AM, Falcão JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiol.* 2012; 32:254-64.
15. Campioni F, Zoldan MM, Falcão JP. Characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. *Epidemiol Infect.* 2014; 142:1403-10.
16. Pang, JC, Lin, JS, Tsai, CC, Tsen, HY. The presence of major world-wide clones for phage type 4 and 8 *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and the evaluation of their virulence levels by invasiveness assays in vitro and in vivo. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; 263:148-54.
17. Shah DH, Zhou X, Addwebi T, Davis MA, Orfe L, Call DR, et al. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. *Microbiology.* 2011; 157:1428-45.
18. Shah DH, Zhou X, Addwebi T, Davis MA, Call DR. In vitro and in vivo pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis clinical strains isolated from North America. *Arch Microbiol.* 2011; 193:811-21.

19. Doyle ME. Multidrug-resistant pathogens in the food supply. *Foodborne Pathog Dis.* 2015; 12:261-79.
20. Biedenbach DJ, Toleman M, Wash TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 54:13-21
21. Monno R, Rizzo C, De Vito D, Nucleo E, Migliavacca R, Pagani L, et al. Prevalence, antimicrobial resistance and extended-spectrum beta-lactamases characterization of *Salmonella* isolates in Apulia, Southern Italy (2001-2005). *Microb Drug Resist.*, 2007; 13:124-9.
22. Oliveira FA, Brandelli A, Tondo EC. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *New Microbiol.* 2006; 29:49-54.
23. Vaz CS, Streck AF, Michael GB, Marks FS, Rodrigues DP, Dos Reis EM, et al. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poult Sci.* 2010; 89:1530-6.
24. Kottwitz LB, Scheffer MC, Dalla-Costa LM, Farah SM, Moscalewski WS, Magnani M, et al. Molecular characterization and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. *J Med Microbiol.* 2011; 60:1026-31.

25. Costa RG, Festivo ML, Araujo MS, Reis EM, Lázaro NS, Rodrigues DP. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. *J Food Prot.* 2013; 76:2011-7.
26. Capalunga R, Ramos RC, Both JM, Soeiro ML, Longaray SM, Haas S, et al. *Salmonella* serotypes, resistance patterns, and food vehicles of salmonellosis in southern Brazil between 2007 and 2012. *J Infect Dev Ctries.* 2014; 18:811-7.
27. Rowlands RE, Ristori CA, Ikuno AA, Barbosa ML, Jakabi M, Franco BD. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56:461-7.
28. Soumet C, Ermel G, Rose V. Evaluation of a multiplex PCR assay for simultaneous identification of *Salmonella* sp., *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium from environmental swabs of poultry houses. *Lett Appl Microbiol.* 1999; 28: 113-7.
29. Guerra B, Laconcha I, Soto SM, Gonzalez-Hevia MA, Mendoza MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiol Lett.* 2000; 190: 341-47.
30. Bohez L, Ducatelle R, Pasmans F, Botteldoorn N, Haesebrouck F, Van Immerseel F. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the HilA regulatory protein. *Vet Microbiol.* 2006;116:202-10.

31. Fardini Y, Chettab K, Grepinet O, Rochereau S, Trotureau J, Harvey P, et al. The YfgL lipoprotein is essential for Type III Secretion System expression and virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Infect Immun*. 2007; 75:358–70.
32. Kiss T, Morgan E, Nagy G. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. *FEMS Microbiol Lett*. 2007; 275:153–9.
33. Rosa ACP, Vieira MAM, Tibana A, Gomes TAT, Andrade JRC. Interactions of *Escherichia coli* of non-EPEC serogroups that carry *eae* and lack EAF and *stx* gene sequences with undifferentiated and differentiated intestinal human Caco-2 cells. *FEMS Microbiol Lett*. 2001; 200:117-22.
34. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard- Eighth Edition. CLSI document M100-S25 [ISBN 1-56238-989-0]. CLSI, 950 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2015.
35. Rawat D, Nair D. Extended-spectrum β -lactamases in gram-negative bacteria. *J Glob Infect Dis*. 2010; 2: 263-74
36. Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2010; 65:490-5.

37. Heithoff DM, Shimp WR, Lau PW, Badie G, Enioutina EY, Daynes RA. Human *Salmonella* clinical isolates distinct from those of animal origin. *Appl Environ Microbiol.* 2008; 74:1757-66.
38. Yim L, Betancor L, Martinez A, Giossa G, Bryant C, Maskell D, et al. Differential phenotypic diversity among epidemic-spanning *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates from humans and animals. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76:6812-20.
39. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Hautefort I, Thompson A, et al. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72:946-9.
40. Lorkowski M, Felipe-López A, Danzer CA, Hansmeier C, Hensel M. *Salmonella enterica* invasion of polarized epithelial cells is a highly cooperative effort. *Infect Immun.* 2014; 82:2657-67.
41. Piddock, LJ. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. *FEMS Microbiol Rev.* 2002; 26:3-16.
42. Chen S, Cui S, McDermott PF, Zhao S, White DG, Paulsen I, et al. Contribution of target gene mutations and efflux to decreased susceptibility of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to fluoroquinolones and other antimicrobials. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51:535-42.

43. Cavaco LM, Hasman H, Xia S, Aarestrup FM. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:603–8.
44. Le Hello S, Hendriksen RS, Doublet B, Fisher I, Nilesene M, Whichard JM . International spread of an epidemic population of *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198 resistant to ciprofloxacin. *J Infect Dis.* 2011; 204:675-84.
45. Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect.* 2006; 8:1937-44.
46. Fonseca EL, Mykytczuk OL, Asensi MD, Reis EM, Ferraz LR, Paula FL, et al. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:2767-72.
47. Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Nascimento VP. Resistência antimicrobiana em *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas e ambientais de frangos de corte e matrizes pesadas. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2008; 60:1259-62.
48. Ribeiro VB, Lincopan N, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in Multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. *Braz J Microbiol.* 2011; 42:685-92.

49. Silva KC, Fontes LC, Moreno AM, Astolfi-Ferreira CS, Ferreira AJ, Lincopan N. Emergence of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-2-producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57:3458-9.
50. Bonnet R, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viallard JL, et al. A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marscescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 3061–68.
51. Garcia DO, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TMI, Leite D, et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 1790–93.
52. Fernandes SA, Paterson DL, Ghilardi-Rodrigues AC , Adams-Haduch JM, Tavechio AT, Doi Y. CTX-M-2- producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microb Drug Resist.* 2009; 15: 317–21.
53. Andrade LN, Minarini LA, Pitondo-Silva A, Clímaco EC, Palazzo IC, Medeiros MI, et al. Determinants of beta-lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. *Can J Microbiol.* 2010; 56:399-407.
54. Clímaco EC, Minarini LA, da Costa Darini AL. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010; 68:186-9.

55. Queiroz MLP. Caracterização de beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs), genes de resistência aos antimicrobianos e conteúdo plasmidial em cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. não-tifóides isoladas do ambiente hospitalar e da comunidade. Rio de Janeiro, UERJ, 2012. 119 p. PhD thesis (Microbiology). Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

56. Mulvey MR, Boyd DA, Baker L, Mykytczuk O, Reis EM, Asensi MD, et al. Characterization of a *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type β -lactamase (*bla*OXA-53) and 60'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [*aac*(60')-I30].
J Antimicrob Chemother. 2004; 54:354–59.

57. Gelinski JM, Bombassaro A, Baratto CM, Vicente VA. Resistance to extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57:3458-59

Table 1. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis strains evaluated.

Year	Region ^(a)	Source of isolation:			Total
		Animals ^(b)	Food ^(c)	Humans ^(d)	
2006	NE (3); S (19); N (1); SE (6); MW (3)	8 (25)	14 (43.7)	10 (31)	32
2007	NE (2); S (22); N (1); SE (14); MW (4)	5 (11.6)	23 (53)	15 (34.8)	43
2008	NE (1); S (16); SE (12); MW (4)	10 (30)	10 (30)	13 (39)	33
2009	NE (3); S (10); N (1); SE (10); MW (1)	3 (12)	15 (60)	7 (28)	25
2010	NE (2); S (19); N (2); SE (6); MW (1)	7 (23)	13 (43)	10 (33)	30
Total		33 (20)	75 (46)	55 (33.7)	163 (100)

(a) Brazilian geopolitical regions: NE, Northeast; S, South; N, North; SE, Southeast; MW, Midwest ; (n) no. of strains

(b) poultry (23); cattle (10)

(c) poultry-derived (39); raw/cooked beef (31); unknown (5)

(d) blood (19); stool (16); unknown (20)

Table 2. *Salmonella* Enteritidis association and bacterial invasion of differentiated and polarized monolayers of Caco-2 cells after 3h-infection.

Strains ^(a)	Source	Interaction with Caco-2 cells:				
		Bacterial counts (CFU/monolayer) ^(b)		Number of tests	Association index ^(c)	Invasion index ^(d)
		Cell-associated	Intracellular			
<i>S. Enteritidis</i> – human infections						
2/8	stool	$2.4 \pm 1.0 \times 10^7$	$1.4 \pm 0.5 \times 10^5$	2	240	0.5
5/8	stool	$1.9 \pm 0.1 \times 10^6$	$4.1 \pm 0.1 \times 10^4$	2	19	2.1
327/10	stool	$3.3 \pm 1.4 \times 10^6$	$5.3 \pm 0.7 \times 10^4$	2	33	1.6
2404/8	stool	$1.8 \pm 0.7 \times 10^6$	$9.5 \pm 0.3 \times 10^3$	2	18	0.5
3270/10	stool	$7.0 \pm 2.6 \times 10^5$	$2.3 \pm 0.2 \times 10^4$	2	0.7	3.3
3337/8	stool	$3.4 \pm 1.2 \times 10^7$	$2.4 \pm 0.2 \times 10^5$	2	340	0.7
4647/9	stool	$1.1 \pm 0.5 \times 10^7$	$6.2 \pm 1.0 \times 10^4$	2	110	0.5
4648/9	stool	$1.7 \pm 0.1 \times 10^7$	$7.3 \pm 1.0 \times 10^4$	2	117	0.4
8936/8	stool	$8.6 \pm 0.3 \times 10^5$	$2.2 \pm 0.1 \times 10^4$	2	8.6	2.5
287/8	blood	$2.8 \pm 0.1 \times 10^7$	$2.0 \pm 0.5 \times 10^5$	2	280	0.7
667/10	blood	$2.6 \pm 1.6 \times 10^7$	$1.2 \pm 0.1 \times 10^6$	2	260	4.6
1899/7	blood	$1.1 \pm 0.1 \times 10^7$	$7.0 \pm 1.4 \times 10^4$	2	110	0.6
3395/9	blood	$1.3 \pm 0.5 \times 10^7$	$3.1 \pm 2.4 \times 10^4$	2	130	2.4
4719/10	blood	$6.0 \pm 0.1 \times 10^5$	$2.7 \pm 0.1 \times 10^4$	2	6.0	4.5
7751/8	blood	$2.7 \pm 0.8 \times 10^7$	$1.3 \pm 0.6 \times 10^4$	2	270	0.04
8805/10	blood	$2.7 \pm 0.3 \times 10^6$	$2.2 \pm 0.1 \times 10^4$	2	27	0.8
290/6	unknown	$1.9 \pm 0.1 \times 10^6$	$3.2 \pm 0.8 \times 10^4$	2	19	1.7
317/7	unknown	$3.2 \pm 0.4 \times 10^6$	$2.9 \pm 0.2 \times 10^4$	2	32	0.9
495/6	unknown	$3.4 \pm 0.4 \times 10^6$	$2.7 \pm 0.1 \times 10^4$	2	34	0.8
4524/8	unknown	$2.9 \pm 0.5 \times 10^7$	$1.1 \pm 0.8 \times 10^5$	2	290	0.4
9360/6	unknown	$2.7 \pm 0.3 \times 10^6$	$2.7 \pm 0.1 \times 10^4$	2	27	1.0
11477/6	unknown	$2.0 \pm 0.1 \times 10^4$	$5.6 \pm 0.4 \times 10^2$	2	0.2	2.8

12009/6	unknown	$4.7 \pm 0.4 \times 10^6$	$2.5 \pm 0.3 \times 10^4$	2	47	0.5
12014/6	unknown	$1.7 \pm 0.1 \times 10^6$	$5.0 \pm 0.3 \times 10^4$	2	17	2.9
12873/7	unknown	$1.1 \pm 0.6 \times 10^7$	$5.3 \pm 1.0 \times 10^4$	2	110	0.5
<i>S. Enteritidis</i> – poultry-derived foods						
1084/8		$2.8 \pm 0.2 \times 10^7$	$2.8 \pm 0.4 \times 10^5$	2	280	1.0
3230/10		$5.0 \pm 0.7 \times 10^6$	$6.1 \pm 0.3 \times 10^4$	2	50	1.2
5548/7		$2.4 \pm 0.1 \times 10^5$	$1.9 \pm 1.2 \times 10^3$	2	2.4	0.8
9902/10		$1.9 \pm 0.8 \times 10^7$	$2.6 \pm 0.1 \times 10^5$	2	190	1.4
11233/10		$5.0 \pm 0.1 \times 10^6$	$3.5 \pm 1.0 \times 10^4$	2	50	0.7
11466/6		$2.7 \pm 0.3 \times 10^6$	$2.6 \pm 0.1 \times 10^4$	2	27	0.9
17336/9		$3.6 \pm 0.8 \times 10^7$	$2.4 \pm 0.2 \times 10^5$	2	360	0.6
<i>S. Enteritidis</i> – chickens						
60/10		$3.3 \pm 0.7 \times 10^6$	$2.3 \pm 0.5 \times 10^4$	2	33	0.7
130/8		$5.0 \pm 0.1 \times 10^6$	$4.1 \pm 0.6 \times 10^4$	2	50	0.8
176/9		$1.2 \pm 0.1 \times 10^7$	$8.3 \pm 2.2 \times 10^4$	2	120	0.7
193/8		$3.6 \pm 0.5 \times 10^7$	$2.9 \pm 0.3 \times 10^5$	2	360	0.8
1224/8		$1.7 \pm 0.2 \times 10^6$	$3.8 \pm 0.8 \times 10^4$	2	17	2.2
2912/7		$3.0 \pm 0.1 \times 10^7$	$1.9 \pm 0.1 \times 10^5$	3	300	0.6
7666/10		$2.6 \pm 0.7 \times 10^7$	$3.5 \pm 0.6 \times 10^4$	2	260	0.1
10253/6		$2.1 \pm 1.2 \times 10^7$	$6.3 \pm 1.7 \times 10^4$	2	210	0.3
<i>S. Typhimurium</i>						
C-20	gastroenteritis outbreak; invasive strain	$1.6 \pm 0.1 \times 10^6$	$4.9 \pm 1.0 \times 10^4$	10	16	3.2
<i>Escherichia coli</i>						
C600	laboratory strain; negative control for invasion (K12)	$2.7 \pm 0.1 \times 10^5$	$7.0 \pm 1.1 \times 10^2$	10	2.7	0.2

(a) all *S. Enteritidis* strains were positive for the 14 virulence genes tested; (b) mean (\pm SD) of 2 or more independent tests, in triplicate; (c) association index: percentage of the ratio between cell-associated bacteria (extracellular+intracellular) and the original inoculum (1.0×10^7 CFU); (d) invasion index: percentage of the ratio between intracellular bacteria (amikacin-treated cells) and the cell-associated bacteria.

Table 3. Resistant phenotypes of multidrug-resistant (MDR) *Salmonella* Enteritidis identified in this study.

Resistant phenotypes	Source of isolation:			Total
	Animals	Food	Humans	
NAL, NIT, TCY	-	-	1	1 (9.09)
CHL, NAL, STR	-	-	1	1 (9.09)
FOS, NAL, NIT	-	1	-	1 (9.09)
NAL, NIT, STR	-	1	-	1 (9.09)
CIP, GEN, NAL, NIT	-	-	1	1 (9.09)
AMP, CEP, CHL, CIP, NIT	-	-	1	1 (9.09)
AMP, CHL, NAL, NIT, TCY	-	-	1	1 (9.09)
CEP, CRO, CIP, GEN, NAL	-	-	1	1 (9.09)
AMP, CEP, CHL, CIP, NAL, NIT	-	-	2	2 (18.2)
AMP, CEP, CHL, CRO, CIP, NAL, NIT	-	-	1	1 (9.09)
Total	-	2 (18)	9 (81.8)	11 (100)

MDR: acquired non-susceptibility to at least one agent in three or more antimicrobial categories.

AMP, ampicillin; CRO, ceftriaxone; CEP, cephalothin; CHL, chloramphenicol; CIP, ciprofloxacin ; GEN, gentamicin;

NAL, nalidixic acid; NIT, nitrofurantoin; FOS, phosphomycin; STR, streptomycin; TCY, tetracycline;

SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole.

ANEXO - Comprovação de submissão do 1^o artigo científico**BMC Research Notes - Editorial Office**

Para

Rossiane de Moura Souza

Ago 21

Dear Mrs Souza,

We are pleased to inform you that your submission entitled: "Virulence genes, enterocyte invasion and antimicrobial resistance of Salmonella enterica serovar Enteritidis isolated in Brazil from 2006 through 2010." has been assigned to the Editor(s).

The manuscript id is: RESN-D-15-00126

Please refer to this number in any future correspondence.

You may track the status of your submission via: <http://resn.edmgr.com/>

If you have forgotten your username or password please use the "Send Username/Password" link to get your login information. For security reasons, your password will be reset.

Thank you for your submission to BMC Research Notes.

Best wishes,

Editorial Office

BMC Research Notes

<http://www.biomedcentral.com/bm CresNotes/>