



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE AGENTES
INFECCIOSOS E PARASITÁRIOS

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Salmonella enterica*
sorovar Panama DE ORIGEM AMBIENTAL, HUMANA,
ANIMAL E ALIMENTO, NO ESTADO DO PARÁ.**

NEILA PATRÍCIA MONTEIRO BRITO

Belém-Pará
2010

NEILA PATRÍCIA MONTEIRO BRITO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Salmonella enterica*
sorovar Panama DE ORIGEM AMBIENTAL, HUMANA,
ANIMAL E ALIMENTO, NO ESTADO DO PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Belém-Pará
2010

NEILA PATRÍCIA MONTEIRO BRITO

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Salmonella enterica*
sorovar Panama DE ORIGEM AMBIENTAL, HUMANA,
ANIMAL E ALIMENTO, NO ESTADO DO PARÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para obtenção de grau de Mestre em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários.

Orientador: Prof. Dr. Edvaldo Carlos Brito Loureiro
Instituto Evandro Chagas – IEC/SVS/MS

Banca Examinadora: Profa. Dra. Marluísa de Oliveira Guimarães Ishak
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Prof. Dr. Luiz Fernando Almeida Machado
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dra. Lena Líllian Canto de Sá
Instituto Evandro Chagas/SVS/MS

Prof. Dr. Antônio Carlos Rosário Vallinoto (suplente)
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Belém, 27 de setembro de 2010

Esta obra eu dedico a Deus e aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Senhor e Salvador Jesus Cristo, toda a honra, glória e poder.

Ao meu pai, por seu amor e dedicação, sempre presentes durante toda a minha vida.

À minha mãe, por seu amor e dedicação, sempre presentes durante toda a minha vida.

Ao Dr. Edvaldo Loureiro, pesquisador titular do Instituto Evandro Chagas e pesquisador responsável pelo laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, por sua orientação e amizade durante todo o desenvolvimento deste trabalho, orientando desde as etapas preliminares de levantamento bibliográfico, escritura do projeto de mestrado, passando pela fase prática de laboratório, também do cumprimento das disciplinas de mestrado, acompanhando até a conclusão, contribuindo também sobremaneira para ampliar meu conhecimento na área da bacteriologia.

À Dra. Lena Sá, pesquisadora responsável pelo laboratório de Microbiologia Ambiental/IEC, por sua grande colaboração e amizade durante a execução deste trabalho, contribuindo em ceder o laboratório de Microbiologia Ambiental para caracterização genotípica das amostras, bem como com a metodologia aplicada neste trabalho tanto para caracterização genotípica quanto para análise dos dados.

À Dra. Maria Luiza, chefe da Seção de Bacteriologia e Micologia/IEC por sua colaboração com este trabalho por meio da concessão do laboratório de Bacteriologia Geral para a realização dos antibiogramas.

A CAPES pelo incentivo financeiro importante para a realização desse estudo;

Ao Sr. José Caetano, técnico do laboratório de Bacteriologia Geral, por sua grande contribuição na realização dos antibiogramas, tanto pelo método automatizado quanto pelo método de difusão com discos.

Ao Sr. Pio Girhard, técnico do laboratório de Microbiologia Ambiental/IEC, por sua grande contribuição na caracterização genotípica das amostras.

À Sra. Dolores dos Santos, técnica do laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, por sua contribuição no reisolamento e reidentificação das amostras.

À Sra. Geralda Resende, técnica do laboratório de Microbiologia Ambiental/IEC, por sua contribuição durante meu estágio no laboratório de Microbiologia Ambiental.

À Sra. Odete Arouche, técnica do laboratório de Bacteriologia Geral/IEC, por sua contribuição na realização dos antibiogramas.

Ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação de Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará pelos ensinamentos recebidos.

Ao Programa de Pós-Graduação de Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará, que proporcionou a base curricular durante meu curso por meio das disciplinas realizadas durante o mestrado, que aumentaram e aperfeiçoaram meu conhecimento nessa área de atuação.

Ao Instituto Evandro Chagas, onde realizei todo o meu estágio e executei toda a parte laboratorial da dissertação de mestrado, onde também adquiri o conhecimento técnico-científico na área de Bacteriologia, especificamente de enteropatógenos bacterianos.

SUMÁRIO

	RESUMO	8
	ABSTRACT	9
1	INTRODUÇÃO	10
1.1	O GÊNERO <i>Salmonella</i>	10
1.1.1	Considerações Gerais	10
1.1.2	Classificação e Nomenclatura	11
1.2	SALMONELOSE.....	13
1.2.1	Etiologia e patogenicidade	13
1.2.2	Manifestações clínicas	14
1.2.3	Epidemiologia	17
1.2.3.1	Transmissão.....	17
1.2.3.2	Distribuição geográfica de <i>Salmonella</i>	17
1.2.3.3	<i>Salmonella</i> em ambientes aquáticos.....	23
1.3	CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE <i>Salmonella</i>	27
1.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	31
1.5	OBJETIVOS.....	33
1.5.1	Objetivo Geral	33
1.5.2	Objetivos específicos	33
2	MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1	MODELO DE ESTUDO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS.....	34
2.2	MÉTODOS LABORATORIAIS.....	37
2.2.1	Reisolamento, Identificação e Manutenção das culturas de <i>Salmonella</i> Panama	37
2.2.2	Análise da susceptibilidade a agentes antimicrobianos	38

2.2.3	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado.....	40
2.2.4	Aspectos Éticos.....	42
3	RESULTADOS.....	43
4	DISCUSSÃO.....	61
5	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77

RESUMO

Um total de 110 amostras de *Salmonella* Panama, incluindo 84 amostras ambientais, 16 amostras humanas, 5 amostras de alimentos e 5 amostras de animal silvestre provenientes de municípios no Estado do Pará, Brasil, foi submetido ao teste de sensibilidade a agentes antimicrobianos e à tipagem genotípica por PFGE. Todas as amostras analisadas apresentaram multirresistência a, pelo menos, 5 antibióticos. O modelo de resistência mais freqüente abrangeu 85 (77,3%) das amostras de *S. Panama* e foi representado pelos antibióticos cefalotina, cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, gentamicina e tobramicina. A tipagem PFGE de 89 isolados de *S. Panama* resultou em 54 perfis genotípicos diferentes, dentre os quais foi observada a ocorrência de 16 clones. O dendograma revelou a existência de 2 grupos PFGE, designados grupo A e grupo B, definidos com uma similaridade genética de 83,34% e 83,87%, respectivamente. O maior clone e mais prevalente com 8 isolados de *S. Panama* foi oriundo de ambientes aquáticos dos municípios de Belém e Barcarena. Um segundo clone com 5 isolados foi proveniente de diferentes igarapés da Floresta Nacional de Caxiuanã. Ambos os clones demonstraram persistir no ambiente aquático por pelo menos 2 anos. Os 5 clones de *Salmonella* Panama encontrados em ambientes aquáticos da Floresta Nacional de Caxiuanã, que se caracteriza por apresentar ação antrópica mínima, não foram detectados em municípios mais impactados pela ação do homem como Belém e Barcarena, sugerindo adaptação dos mesmos em relação não só aos respectivos ambientes mas, principalmente, à reservatórios diferentes.

ABSTRACT

A total of 110 isolates of *Salmonella* Panama, including 84 environmental isolates, 16 human isolates, 5 food isolates and 5 isolates of wild animal obtained from different cities in the state of Pará, Brazil, was submitted to antimicrobial susceptibility testing and genotypic typing by PFGE. All the isolates were multiresistant for at least 5 antibiotics. The most frequent resistance pattern involved 85 (77,3%) of isolates and was represented by cephalotin, cephalazolin, cephuroxime, cephoxitin, gentamicin and tobramycin. PFGE typing of 89 isolates of *S. Panama* resulted in 54 distinct genotypic profiles, within them were detected 16 clones. The dendogram revealed 2 major PFGE clusters, designated cluster A and cluster B, that were defined with 83,34% and 83,87% of genetic similarity, respectively. The major and most prevalent clone with 8 isolates of *S. Panama* was detected in aquatic environments in Belém and Barcarena. Another clone with 5 isolates was detected in superficial waters in the Caxiuanã National Forest. Both clones persisted on the environment over the years. *Salmonella* Panama clones found in aquatic environments in the Caxiuanã National Forest, under environmental protection, were not detected in the cities with evidential antropoc action like Belém e Barcarena, suggesting not only adaptation of clones to the different environments, but mainly to different reservoirs.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O GÊNERO *Salmonella*

1.1.1 Considerações gerais

O gênero *Salmonella* é composto de bacilos Gram-negativos que medem de 0,7 a 1,5 μm de largura por 2 a 5 μm de comprimento, a maioria é móvel com flagelos peritríqueos; são anaeróbios facultativos e apresentam as seguintes características bioquímicas: oxidase negativa, catalase positiva, prova de sulfeto de hidrogênio positiva, indol e Voges-Proskauer negativos, citrato de Simmons positivo e lisina e ornitina descarboxilase positivas. As salmonelas são fermentadores da glicose e de outros carboidratos, produzindo ácido e, geralmente, gás (Le Minor, 1984).

Salmonella pertence à família Enterobacteriaceae e os representantes desse gênero podem causar doenças no homem e em muitos animais (Varnam & Evans, 1991). Alguns estudos demonstraram que a dose infectante para sorovares não adaptados exclusivamente ao homem, como *S. Typhimurium*, varia de 10^5 a 10^7 bactérias, embora doses inferiores a 10^3 bactérias já tenham sido registradas pela ingestão de água e alimentos contaminados (Varnam & Evans, 1991); enquanto a *Salmonella Typhi* apresenta uma dose infectante média de 10^3 bactérias (Blaser & Newman, 1982). De um modo geral, a *Salmonella* pode se multiplicar em uma variação de temperatura de 5 °C à 45 °C, com um temperatura ótima de crescimento em torno de 37 °C, enquanto o pH varia de 4.5 a 9.0, com um pH ótimo no valor de 7.5 (Varnam & Evans, 1991).

A salmonelose pode ser causada por uma grande variedade de sorotipos de *Salmonella* e a frequência desses sorotipos varia de acordo com a época, região e situação epidemiológica. As infecções por *Salmonella* se apresentam, na maioria das

vezes, sob a forma de gastroenterite aguda, embora possam causar infecções extra-intestinais. Os sorotipos Typhi e Paratyphi A, B e C são agentes das febres entéricas no homem, doenças infecciosas de caráter agudo causadas pela ingestão de água contaminada, a disseminação desses patógenos no ambiente é um fenômeno comum, e a excreção assintomática de *S. Typhi* nas fezes humana pode persistir por semanas, meses e anos (Franzolin *et al.*, 2005; Ferreira & Campos, 2008), o que favorece a endemicidade da febre tifoide em algumas regiões do país.

1.1.2 Classificação e Nomenclatura

A classificação e a nomenclatura da *Salmonella* sofreram várias modificações no decorrer dos anos. Borman *et al.* (1944) propuseram três espécies de *Salmonella* (*S. typhosa*, *S. choleraesuis* e *S. kauffmannii*). Em 1980, foi aprovada uma lista com cinco espécies: *S. arizonae*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhi* e *S. typhimurium* (Skerman *et al.*, 1980). Em seguida, Le Minor *et al.* (1982a) propuseram que todos os sorovares de *Salmonella* fossem reunidos em uma única espécie: *S. choleraesuis*, incluindo seis subespécies: *S. choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *S. choleraesuis* subsp. *salamae*, *S. choleraesuis* subsp. *arizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *S. choleraesuis* subsp. *houtenae* e *S. choleraesuis* subsp. *bongori*. Quatro anos depois foi descrita a sétima subespécie, denominada *S. choleraesuis* subsp. *indica* (Le Minor *et al.*, 1986).

A classificação atual baseia-se em estudos de hibridização do DNA e possibilita a divisão do gênero *Salmonella* em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori* (Le Minor & Popoff, 1987; Reeves *et al.*, 1989; Popoff, 2001; Popoff *et al.*, 2004). Sendo que a *Salmonella enterica* inclui seis subespécies definidas por suas

características bioquímicas e antigênicas (Le Minor & Popoff, 1987; Reeves *et al.*, 1989). A utilização do esquema de Kauffmann & White (Quadro 1), que tem por base a composição antigênica das salmonelas em relação aos seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar), permitiu a identificação de 2.541 sorovares, dentre estes, 2519 pertencem à espécie *enterica* e 1504 a subespécie *enterica* (Quadro 2). Na nomenclatura atual, os nomes dos sorovares de *Salmonella* da subespécie *enterica* não são mais escritos em itálico e aparecem com a primeira letra em maiúscula. (Ferreira & Campos, 2008)

Quadro 1- Esquema abreviado de Kauffmann & White (Ferreira & Campos, 2008) que divide o gênero *Salmonella* em sorovares com base nos seus antígenos O, Vi e H.

Sorovar	Grupo	Antígeno O	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
<i>S. Paratyphi A</i>	O:2 (A)	1,2,12	a	[1,5]*
<i>S. Paratyphi B</i>	O:4 (B)	1,4,[5],12	b	1,2
<i>S. Typhimurium</i>		1,4,[5],12	i	1,2
<i>S. Agona</i>		1,4,12	f,g,s	[1,2]
<i>S. Derby</i>		1,4,[5],12	f,g	[1,2]
<i>S. Saintpaul</i>		1,4,[5],12	e,h	1,2
<i>S. Choleraesuis</i>	O:7 (C1)	6,7	c	1,5
<i>S. Oraniemburg</i>		6,7,14	m,t	[z57]
<i>S. Infantis</i>		6,7,14	r	1,5
<i>S. Newport</i>	O:8 (C2-C3)	6,8,20	e,h	1,2
<i>S. Typhi</i>	O:9 (D1)	9,12 [Vi]	d	-
<i>S. Enteritidis</i>		1,9,12	g,m	-
<i>S. Anatum</i>	O:3,10 (E1)	3,10[15]15,34]	e,h	1,6

[*] pode ou não ocorrer

Os antígenos O de natureza polissacarídica são designados por números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*. Só existe um tipo imunológico de antígeno Vi, sendo encontrado apenas em *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*. Os antígenos flagelares constituídos da proteína (flagelina) são designados por letras minúsculas e números arábicos e podem ocorrer em duas fases (1 e 2) cujos flagelos são

codificados, respectivamente, pelos genes H₁ e H₂. Quando H₂ está funcionando, ele dirige a síntese do flagelo de fase 2 e de uma proteína repressora do gene H₁, que bloqueia este gene e proporciona a mudança para a fase 2. A maioria das salmonelas possui flagelos de fase 1 e fase 2 (bifásicas), outras possuem flagelos de uma só fase (monofásicas), e algumas não possuem flagelos (imóveis) (Ferreira & Campos, 2008).

Quadro 2- Distribuição dos números de sorovares de *Salmonella* de acordo com espécies e subespécies

Espécies	Subespécies	Nº de sorovares
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>	1504
	<i>salamae</i>	502
	<i>arizonae</i>	95
	<i>diarizonae</i>	333
	<i>houtenae</i>	72
	<i>indica</i>	13
<i>S. bongori</i>		22
	Total	2.541

Fonte: Le Minor & Popoff (1987); Reeves *et al.* (1989)

1.2 SALMONELOSE

1.2.1 Etiologia e patogenicidade

A salmonelose tem distribuição universal, atingindo crianças e adultos. A patogenicidade depende do tipo sorológico da *Salmonella*, da idade e condições de saúde do hospedeiro (Trabulsi *et al.*, 2002). As salmonelas são habitantes do trato intestinal do homem e de uma variedade de animais, incluindo aves e répteis (Varnam & Evans, 1991). Alguns sorotipos de *Salmonella* infectam exclusivamente o hospedeiro humano, como a *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C. Outros sorotipos são naturalmente

adaptados a uma determinada espécie animal, como a *S. Abortusovis* (carneiro), *S. Gallinarum* (aves), *S. Choleraesuis* (porco) e *S. Dublin* (bovinos), ou podem ser ubiqüitários, infectando diferentes animais, inclusive o homem, como a *S. Typhimurium* (Uzzau *et al.*, 2000).

A infecção por *Salmonella* inicia-se na mucosa intestinal. A bactéria penetra pela região apical dos enterócitos ou através das células M, estas últimas transportam a bactéria para os macrófagos do tecido subjacente, onde a bactéria pode permanecer internalizada em um vacúolo denominado fagossoma ou induzir a apoptose do macrófago e se localizar na lâmina própria da mucosa. A infecção por *Salmonella* pode causar desde uma gastroenterite aguda, até uma infecção sistêmica quando a bactéria se dissemina atingindo os linfonodos, em seguida o fígado e baço, podendo atingir também os demais órgãos pela corrente sangüínea. Muitos fatores de virulência estão envolvidos na patogênese da infecção por *Salmonella* entre eles a endotoxina, equivalente ao lipídio A do lipopolissacarídeo de membrana, que são responsáveis pelo aumento dos níveis de anticorpos; as enterotoxinas termolábil e termoestável, que atuam na permeabilidade da mucosa; uma citotoxina que lesa diretamente a mucosa intestinal, e adesinas que interagem com a superfície do epitélio intestinal durante a colonização, além de outras proteínas translocadas para superfície celular ou secretadas pelo aparelho secretório do tipo III, como a proteína de invasão da *Salmonella* (SIP) e proteína da membrana externa da *Salmonella* (SOP), codificadas por ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano as quais, induzem a resposta inflamatória mediada por células do sistema imune (Bäumler *et al.*, 2000).

1.2.2 Manifestações clínicas

As infecções humanas causadas por *Salmonella* correspondem à gastroenterite aguda, forma clínica mais comum, bacteremias em consequência de focos de infecção extra-intestinais e as febres entéricas (tifóide e paratifóides). A gastroenterite por *Salmonella* inicia-se, geralmente, em 48 horas, podendo esse período ser menor ou maior variando de poucas horas até três dias, as manifestações clínicas características são febre, cefaléia, mal-estar, náuseas, vômitos, anorexia, diarréia aquosa com ou sem estrias de sangue e dor abdominal. Em geral, a doença é autolimitada com duração de dois a cinco dias. A infecção pode ser prolongada e mais grave em lactantes, idosos e pacientes imunodeprimidos (AIDS, neoplasias e pacientes sob o uso de imunossupressores) (Trabulsi *et al.*, 2002).

A disseminação hematogênica da *Salmonella* pode ocasionar processos sistêmicos ou localizados, com o comprometimento de meninges, ossos, articulações e outros (Trabulsi *et al.*, 2002). Os pacientes imunodeprimidos são mais susceptíveis a desenvolver bacteremia e infecções focais em muitos órgãos (Hohmann, 2001).

A febre tifóide apresenta diferentes etapas fisiopatológicas e inicialmente se caracteriza por febre, que aumenta de forma progressiva, dor abdominal, vômitos, anorexia, astenia e cefaléia, com intensidade paralela à febre, em seguida a febre se estabiliza entre 39 e 40 °C, o paciente entra em estado de torpor e delírio, a diarréia é abundante e esverdeada, é característico o aparecimento de roséolas tíficas sobre a pele. A febre tifóide pode levar a danos respiratórios, hepáticos, esplênicos e neurológicos. A febre paratifóide se assemelha a febre tifóide, porém é menos severa (Focaccia *et al.*, 2009).

Kostiala *et al.* (1992) reportaram três casos de infecção hospitalar por *Salmonella* Panama em neonatos, mantidos em observação na mesma enfermaria. O primeiro e o segundo neonato desenvolveram bacteremia e meningite, o segundo neonato apresentou abscesso cerebral, atingindo crescimento e desenvolvimento psicomotor normal após seis meses. O terceiro neonato apresentou apenas um quadro de gastroenterite. Os três casos foram relacionados à rota de transmissão fecal-oral, assinalando para a prevenção da salmonelose no ambiente doméstico e hospitalar por meio do hábito da lavagem das mãos. Na Itália, foi relatado um caso de osteomielite em criança do sexo feminino de 17 meses de idade, imigrante da África e portadora de anemia falciforme. Foi detectada lesão no fêmur direito, e após drenagem cirúrgica do material, foi possível cultivar e identificar *Salmonella* Panama. Em seguida a criança foi submetida a período de seis semanas de terapia antibiótica (Busetti *et al.*, 2002).

Na África, Owusu-Ofori & Scheld (2003) relataram dois casos de meningite bacteriana em crianças menores de um ano, que apresentaram cultura de LCR positiva para *Salmonella* e apesar da tentativa de tratamento, as crianças evoluíram rapidamente para óbito em 48 horas após admissão hospitalar. Arora *et al.* (2003) descreveram, na Índia, um caso de osteomielite por *Salmonella* em paciente adulto do sexo masculino com 21 anos de idade, com relato de dor na coxa direita por três meses e histórico de doença febril por 15 dias. A biópsia revelou um tecido inflamatório cuja cultura foi positiva para *Salmonella* Typhi. O paciente recebeu tratamento com antibiótico, demonstrando cultura de urina e fezes negativas para *S. Typhi* após três meses.

Outro caso de meningite por *Salmonella* Panama em recém-nascido foi documentado em Taiwan, sendo o primeiro associado ao consumo de leite materno. *S.*

Panama pode ser detectado no sangue, no líquido cefalorraquidiano (LCR) da criança quanto no leite materno. Concluiu-se por método da biologia molecular (ribotipagem) que os isolados obtidos do sangue e LCR da criança e do leite materno eram genotipicamente indistinguíveis. Não foi descartada a hipótese de contaminação por manipulação direta dos profissionais na enfermaria (Chen *et al.*, 2005).

1.2.3 Epidemiologia

1.2.3.1 Transmissão

A água é um veículo para disseminação da *Salmonella* cujas fontes de contaminação incluem efluentes de esgoto, que freqüentemente transportam fezes de origem humana e animal, assim como dejetos orgânicos de atividades humanas domésticas ou agrícolas. Outra fonte corresponde aos excretos de animais selvagens em ambientes naturais, os quais representam importantes reservatórios para disseminação de *Salmonella*, entre eles podem ser citados os pássaros, roedores e insetos (Murray, 2000).

A salmonelose é uma zoonose, e a infecção no homem está relacionada ao consumo de alimentos mal-cozidos preparados com ovos, frango, carne de gado, leite e derivados contaminados com *Salmonella*. Excluindo-se o leite pasteurizado, embora passível de contaminação, os demais produtos apresentam grande potencial de positividade para *Salmonella* (Humphrey, 2000).

1.2.3.2 Distribuição geográfica de *Salmonella*

Na Irlanda, a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) quando aplicada a 31 isolados de *S. Typhimurium* envolvidos em surto de gastroenterite

identificou dois padrões de restrição distintos, um representado por 22 isolados, e o outro (9 isolados) caracterizou-se por agrupar isolados resistentes à penicilina e cloranfenicol (Corbett-Feeney & Ni Riain, 1998).

Na Espanha, Guallar *et al.* (2004) estudaram 22 isolados de *S. Enteritidis* de pacientes com gastroenterite envolvidos em um surto hospitalar, e observaram que todos os isolados de *S. Enteritidis* apresentaram o mesmo padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos e compartilhavam o mesmo padrão de bandas, após restrição do DNA com *Xba* I e *Spe* I, gerados por PFGE.

Na Tanzânia, durante a investigação de outro surto hospitalar o PFGE foi capaz de agrupar 7 isolados de *S. Enteritidis* obtidos de 5 neonatos com meningite e 2 com septicemia. Todos estes isolados apresentaram resistência ao cloranfenicol e ampicilina (Vaagland *et al.*, 2004).

Na França, Weill *et al.* (2006) obtiveram 45 perfis de restrição por PFGE, após a digestão do DNA de 122 isolados de *S. Typhimurium* com *Xba* I. O perfil de PFGE mais prevalente agrupou 44 isolados (36,1%), dentre estes 28 (63,6%) apresentaram resistência à amoxicilina, cloranfenicol, estreptomicina, espectinomicina, sulfonamidas e tetraciclina.

Um total de 28 cepas de *Salmonella* representada por 6 sorovares foi causa de gastroenterite e infecções focais no sistema urinário, pulmonar, vascular, nervoso e osteoarticular. A análise de macrorestrição do DNA com *Xba* I revelou 13 perfis de bandas geradas por PFGE. Os sorovares *S. Enteritidis* (18 cepas) e *S. Typhimurium* (6 cepas) foram os mais frequentes, representados por 5 perfis de restrição gerados pela enzima (Rodríguez *et al.*, 2006).

Na Espanha, a *Salmonella* Newport foi identificada como causa de um surto de salmonelose, onde 85 casos foram detectados. O surto foi atribuído ao consumo de leite e seus derivados (CDC, 2008).

Kariuki *et al.* (1999) desenvolveram um estudo com 61 isolados de *Salmonella* Paratyphi C, dos quais, 37 foram obtidos no Zaire entre os anos de 1992 a 1996; 2 do Iraque; 2 da África; um isolado da Grécia; 15 da Índia (1983) e 4 outros isolados da Índia de 1960 (2) e 1976 (2). O estudo incluiu o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, perfil plasmidial, padrão de fragmentos da endonuclease de restrição (REFPs) nos plasmídeos e PFGE. Estes autores observaram que os isolados *S. Paratyphi* C de 1996 do Zaire foram resistentes a 5 ou 6 dos antimicrobianos testados e apresentaram uma resistência maior que os isolados de 1992. A tipagem por PFGE distribuiu os 61 isolados em 8 grupos principais, sendo que os isolados do Zaire de 1992 e os da Índia formaram dois grupos independentes. O clone da Índia apresentou também um plasmídeo de 38 MegaDaltons (MDa).

A digestão enzimática com *Xba* I de 193 isolados de *S. Typhi* multidroga-resistentes (MDR), provenientes de países asiáticos, gerou 5 diferentes padrões de PFGE, 30 isolados de *S. Typhi* de Bangladesh caracterizaram um único clone e foram proximamente relacionados aos clones da Índia (2 isolados) e do Kwait (8 isolados) (Mirza *et al.*, 2000).

Na Índia, Misra *et al.* (2005) estudaram uma epidemia de febre entérica com 150 casos registrados, entre crianças e adultos, e encontraram *S. Typhi* em 63% dos casos. No mesmo país, a tipagem por PFGE identificou 2 clones entre 16 cepas de *S. Typhi* relacionadas a um surto de febre tifóide (Chandel *et al.*, 2006). Em estudo realizado no Japão, *S. Enteritidis* foi isolada de espécimes clínicos de 21 pacientes por

ocasião de um surto alimentar. Todos os isolados apresentaram o mesmo padrão de bandas por PFGE e foram sensíveis a todos os antibióticos testados (Kaida *et al.*, 2007).

Gorman & Adley (2004) analisaram 67 isolados de *S. Typhimurium*, compreendendo 28 isolados humanos, 3 de alimentos e 36 de amostras animais, submetendo-os ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos, fagotipagem e PFGE. Em 77,6% dos isolados, foi observada resistência a 5 antibióticos e 5 fagotipos. O fagotipo DT104 correspondeu a 63% dos isolados e foi encontrado entre os isolados humanos, de alimentos e animais, seguido do DT104b com 17,9% dos isolados. Dentre os 67 isolados genotipados por PFGE observou-se que aqueles pertencentes aos fagotipos DT104 e DT104b (n=21) constituíram um único clone que foi representado por isolados de humanos (7 isolados) e de animal (14 isolados).

Tsai *et al.* (2007) analisaram 81 isolados de *Salmonella* provenientes de 81 crianças, reunidas em dois grupos: o primeiro (grupo I) representado por casos de gastroenterite e bacteremia (15 crianças) e o segundo (grupo II) com gastroenterite sem bacteremia (66 crianças). Os isolados foram submetidos a sorotipagem, teste de resistência a antibióticos e PFGE. *S. Enteritidis* foi o sorovar mais encontrado (77,8%), seguido de *S. Panama* (8,6%), tendo sido observado que as crianças infectadas por *Salmonella* Panama estavam mais propensas a desenvolver bacteremia. A análise por PFGE revelou a presença de um clone representado pela maioria dos isolados de *S. Enteritidis*. Dentre os isolados de *S. Panama*, diversos genótipos foram observados. A resistência múltipla (três ou mais drogas) foi encontrada em 19,5% dos isolados, com maior frequência entre os isolados de pacientes do grupo I.

No Japão, a *Salmonella* foi isolada a partir de 106 espécimes fecais de manipuladores de alimentos e 104 espécimes fecais de pacientes sintomáticos tendo

sido a *S. Infantis* o sorovar predominante (24%), seguido da *S. Corvallis* (6,4%) (Murakami *et al.*, 2007).

No Canadá, um estudo com 214 isolados de *S. Typhi* de pacientes com histórico de viagem para Ásia demonstrou que 48 deles (22,4%) apresentaram resistência à ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, estreptomicina, sulfametoxazol, trimetoprim, cotrimoxazol, ticarcilina e piperacilina, além disso, a análise por PFGE com *Xba* I e *Spe* I indicou que a maioria desses isolados multiresistentes apresentou o mesmo perfil de restrição (Harnett *et al.*, 1998).

Nos EUA, Kubota *et al.* (2005) avaliaram por PFGE 139 isolados de *S. Typhi* de pacientes com febre entérica e histórica de viagem internacional. Um clone foi representado por 24 isolados obtidos de pacientes com relato de viagem à Índia. Outro clone compreendeu 12 isolados de pacientes com relato de viagem para o Paquistão. Um terceiro clone incluiu 2 isolados com relato de viagem para o Vietnã. Os isolados (n=3) obtidos de pacientes com relato de viagem à Bangladesh, México e El Salvador representaram também o mesmo clone. Dos 139 isolados, 46 foram multidroga-resistentes (MDR), os quais, distribuíram-se em 4 clones, sendo que um deles agrupou 34 dos 46 isolados.

Sandt *et al.* (2006) realizaram tipagem por PFGE de amostras (n=121) de *Salmonella enterica* dos sorovares Javiana, Thompson, Typhimurium e Muenchen provenientes de espécimes clínicos (humanos); e de *Salmonella Anatum* isoladas de espécimes clínicos (humanos) e de alimentos (tomate), todas envolvidas em um surto de salmonelose nos EUA. Dos 146 isolados de *Salmonella Javiana*, 132 isolados apresentaram o mesmo perfil genotípico, o que caracterizou o clone desse sorovar como a principal causa do surto. Também foi identificado um clone prevalente para cada

sorovar analisado. Além disso, um clone de *Salmonella* Anatum foi identificado entre isolados obtidos de tomate e de espécimes clínicos (humanos).

Nos EUA, Medus *et al.* (2006) revisaram 23 surtos de salmonelose associados a restaurantes, investigando isolados clínicos de clientes e cozinheiros. Os sorovares de *Salmonella enterica* relacionados ao surto incluíram Typhimurium, Heidelberg, Enteritidis, Braenderup, Newport e Montevideo. Isolados de *Salmonella* representando um mesmo clone ou subtipo PFGE foram detectados entre clientes e cozinheiros em 19 surtos. Também foram identificados isolados de *Salmonella* de um mesmo clone entre clientes que freqüentaram o mesmo restaurante. O clone representado por 74 isolados de *S. Heidelberg* foi o que agrupou o maior número de amostras.

Ainda no mesmo país, 29 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, representadas por 7 fagotipos e 13 ribotipos, foram diferenciadas em 14 subtipos pelo método RAPD, quando utilizaram 6 primers. Três cepas de *S. Enteritidis* fagotipo 8, apresentaram o mesmo padrão de bandas pelos métodos PFGE, ribotipagem e RAPD (Lin *et al.*, 1996).

No Caribe, Adesiyun *et al.* (2000) analisaram, por PFGE, 129 isolados de *S. Enteritidis* de pacientes com gastroenterite. A digestão do DNA com a enzima *Xba* I revelou 13 padrões de bandas distintos, o padrão de banda mais prevalente agrupou 88 isolados (68,2%). A digestão com a enzima *Spe* I não foi tão discriminatória quanto com *Xba* I. Neste mesmo estudo observou-se que 51,9% dos isolados exibiam resistência a um ou mais agentes antimicrobianos.

Em muitos países a toxiinfecção alimentar por salmonela emergiu como importante doença humana causada pelo sorovar *S. Enteritidis* (Badrinath *et al.*, 2004; Braden, 2006).

Na Argentina, 15 isolados de *S. Infantis* de humanos provenientes de um mesmo surto, foram avaliados pelo PFGE, ERIC-PCR, Rep-PCR e geraram padrões idênticos, além disso, foram identificados 3 perfis plasmidiais distintos. Todos os isolados também apresentaram resistência à ampicilina e cefalotina (Merino *et al.*, 2003).

Em São Paulo, Peresi *et al.* (1998) avaliaram 906 casos de salmonelose relacionados a surtos de veiculação alimentar notificados entre 1993 e 1997. Cepas de *S. Enteritidis* fagotipo 4 foram isoladas de 80,5% das coproculturas. Em 22 (95,7%) dos surtos a *Salmonella* foi transmitida por alimentos contendo ovos crus e semicrus. Em outro estudo em São Paulo, Fernandes *et al.* (2006) estudaram 3554 isolados de *Salmonella* de casos de infecção humana obtidos entre 1996-2003. Foram identificados 68 sorovares. Sendo a *S. Enteritidis* o sorovar mais freqüente (67,4%) em infecções gastrointestinais e extra-intestinais. *S. Typhimurium* (51 isolados) e *S. enterica* subsp. *enterica* (4,512:i:-) (53 isolados) foram freqüentemente isolados de crianças entre 1 a 4 anos de idade.

Um Estudo conduzido no Rio Grande do Sul mostrou que a *Salmonella* foi a principal causa de doença transmitida por alimentos, envolvendo 8.217 pacientes, dos quais 1.557 foram hospitalizados; a maionese caseira foi a responsável pela maioria dos eventos (Costalunga & Tondo, 2002).

No Paraná, no período de 2002 a 2004, foram notificados 22 surtos de salmonelose e 26 casos esporádicos de infecção humana por *Salmonella*. Doze sorotipos

foram identificados, sendo a *Salmonella* Enteritidis a mais predominante. O referido sorotipo foi isolado em 91% dos surtos e em 61,5% dos casos esporádicos de infecção. Os sorotipos *S. Livingstone* e *S. Muenster* foram responsáveis por 4,5% dos surtos. *Salmonella* Panama (4,2%) foi isolada em dois casos de infecção esporádica (gastroenterite e bacteremia) (Tozetto, 2006).

No Rio de Janeiro, um estudo com 35 cepas de *Salmonella* Infantis isoladas de crianças com gastroenterite permitiu a identificação de 5 perfis de fragmento de restrição. O perfil gerado por PFGE, A1, que incluiu 26 cepas, foi associado aos surtos hospitalares de *S. Infantis* multidroga-resistentes no período de 1996 a 2001 (Fonseca *et al.*, 2006).

1.2.3.3 *Salmonella* em ambientes aquáticos

A ocorrência de uma ampla variedade de sorotipos de *Salmonella* em ambientes aquáticos naturais tem sido bem documentada. A contaminação de águas superficiais por esta bactéria se deve, entre outros fatores, à mobilização dos excretos de animais (reservatórios terrestres) para as águas superficiais ocorrida durante os eventos de inundação (período de chuva). Na França, elevado número de cepas foi registrado em amostras de rio, água de esgoto e água do mar. *S. Typhimurium* (156 isolados) e *S. Newport* (84 isolados) foram os sorovares mais frequentes entre os 574 isolados obtidos (Baudart *et al.*, 2000). Este mesmo estudo registrou que a carga anual de *Salmonella* no rio mediterrâneo foi superior àquela estimada para os pontos da saída de esgoto. Esses registros foram de grande importância sanitária, já que as maiores cargas de *Salmonella* spp. foram detectadas durante o verão, coincidindo com as atividades recreativas de banho e outono quando aumenta a produção e consumo de ostra (Baudart *et al.*, 2000).

Na Inglaterra, foi avaliada a poluição de águas superficiais de 14 sítios de coleta, incluindo rios, córregos e reservatório de água. Amostras de 10 dos 14 sítios foram positivas para *Salmonella*. Os sorovares mais freqüentes foram *S. Agona* (7 isolados), *S. Typhimurium* (4), *S. Senftenberg* (2) e *S. Virchow* (2) (Smith *et al.*, 1978).

Na Espanha, a *Salmonella* foi isolada em 53,6% das amostras de água de irrigação, em que *S. Kapemba*, *S. London* e *S. Blockley* representaram os sorovares mais freqüentes (Ruiz *et al.*, 1987). *Salmonella* spp. foi encontrada na água de um rio na Espanha e os maiores índices de contaminação foram detectados em pontos que recebiam a descarga direta de efluente de esgoto (Moriñigo *et al.*, 1986).

Durante 4 anos foi investigada a distribuição de *Salmonella* em águas costeiras no noroeste da Espanha e sua associação aos eventos de contaminação com diferentes fatores ambientais. *Salmonella* foi isolada em 127 de 5384 amostras de moluscos e água do mar. Foram identificados 20 sorovares diferentes sendo que a *S. Senftenberg* (54 isolados) foi a mais predominante, seguido de *S. Typhimurium* (19 isolados) e *S. Agona* (12 isolados). O sorovar *S. Senftenberg* foi detectado em pontos costeiros específicos, os demais sorovares foram principalmente encontrados em áreas próximas a nascente de rios (Martinez-Urtaza *et al.*, 2004).

Na Índia, a incidência de *S. Irumu*, *S. Panama* e *S. Lexington* foi relatada pela primeira a partir de amostras ambientais. *S. Lexington* (54,8%) foi detectada em amostras de dois biótopos (mangue e estuário), seguido de *S. Panama* (25,8%) isolada de amostras mangue (água e plâncton) e de amostras de estuário (sedimento e água), e *S. Irumu* (19,3%) isolada exclusivamente de água e sedimentos de mangue (Ramamurtphy *et al.*, 1985).

A água de usinas de tratamento de esgoto e dos efluentes dos sistemas de tratamento foi avaliada quanto à presença de *Salmonella* no Sul da Califórnia, EUA. Oito de 12 das usinas tiveram amostras de água de esgoto positivas para *Salmonella*, enquanto os efluentes de 11 usinas foram positivas para *Salmonella*. Um total de 683 isolados de *Salmonella* foi representado por 54 sorovares. Entre os mais freqüentes estavam: *S. Seftenberg* (72/683), *S. Anatum* (42/683) e *S. Oranienburg* (38/683). A detecção de *Salmonella* em pontos de amostragem nos efluentes, situados após os sítios de cloração, foi atribuída à presença de materiais orgânicos e inorgânicos que podem afetar a eficiência da desinfecção e aos baixos níveis de cloro em alguns sítios. Além destes fatores, foi destacada a necessidade de pesquisar novas técnicas, voltadas para quantificação da *Salmonella* em ambientes aquáticos, que possam atuar em conjunto com os testes de rotina para detecção de coliformes (Kinde *et al.*, 1997).

Em estudo realizado na Argentina, Eigner *et al.* (1982) observaram que dos 3665 isolados de *Salmonella* obtidos entre 1979 e 1982, 73,73% eram provenientes de fontes humanas e 26,27% de fontes não-humanas (água, animais e alimentos). *S. Panama* foi o sorovar mais freqüente em amostras de água em 1979 (50 isolados) e em 1980 (26 isolados), entretanto somente em 1981 se nota um aumento em número de isolados de *S. Panama* de origem humana.

No Chile, Sears *et al.* (1984) examinaram a água utilizada na irrigação quanto a presença de *S. Typhi*. Entre as 76 amostras analisadas 8 (11%) foram positivas para *S. Typhi*. Tais amostras foram provenientes de ambientes não contaminados pela poluição química de áreas industriais.

A vigilância dos sorovares de *Salmonella* em ambientes aquáticos constitui um dos principais elementos do monitoramento das infecções humanas e animais (Martins *et al.*, 1986; Martins *et al.*, 1988).

No Brasil, Farias (2000) isolou um total de 221 cepas de *Salmonella* a partir de amostras de água de esgoto e córregos da cidade de São Paulo. Ressalta-se que todas as amostras apresentaram positividade para *Salmonella* e que entre os sorovares Omais prevalentes estavam *S. Panama*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. Onakan* e *S. Braenderup*.

Em decorrência da deficiência de saneamento básico na região Amazônica brasileira, na maioria das vezes as populações ribeirinhas utilizam águas superficiais e de poços freáticos, como únicas fontes de abastecimento doméstico, as quais se encontram precariamente protegidas contra o despejo de dejetos humanos ou de animais, tornando a água um veículo eficiente na transmissão de agentes infecciosos (Feachem, 1983).

Em Belém, Loureiro (1990), analisando 708 amostras de esgoto em Belém, no período de 1975 a 1986, isolou 21 sorovares de *Salmonella* com destaque para *S. Anatum*, *S. Give*, *S. I 9,12:-:1,5* e *S. Miami*. Convém destacar o isolamento de *S. Typhi* em uma amostra do afluente da estação de tratamento de esgoto do UNA. Mais recentemente, o estudo realizado por Ribeiro (2004) demonstrou a identificação de 497 cepas de *Salmonella* spp., isoladas nos cursos d'água dos igarapés Paracuri e Combu, em Belém-PA. Estudo recente realizado por Loureiro (2007) relatou a importância da presença de *Salmonella* em diferentes ecossistemas aquáticos do Estado do Pará. A análise de 694 amostras de águas de diferentes origens (rio, igarapé, baía, praia, lago, poço, nascente, abastecimento, córrego, drenagem e esgoto) coletadas no período entre

1993 a 2002 e procedentes de 11 municípios do Estado do Pará que resultou na observação de que 212 amostras (30,5%) estavam contaminadas por 2.115 cepas de 91 sorovares de *Salmonella*, com destaque para *S. Panama* (10,7%), seguida de *S. Saintpaul* (6,5%), *S. Rubislaw* (5,49%) e *S. Miami* (4,9%).

1.3 CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA de *Salmonella*

A tipagem genotípica oferece vantagem sobre os métodos fenotípicos, pois torna possível que qualquer cepa bacteriana disponível seja tipada, porque as cepas podem não expressar seu fenótipo. Tais métodos moleculares baseados na análise do DNA vêm sendo amplamente empregados para estudos taxonômicos e epidemiológicos, onde isolados bacterianos indistinguíveis, com o mesmo padrão de bandas ou perfil genotípico, podem ser chamados de clones (Farber, 1996).

A tipagem plasmidial consiste na análise do DNA extracromossômico, possui baixa reprodutibilidade, pois o DNA plasmidial é instável e algumas bactérias podem não apresentá-lo (Farber, 1996). A análise de microrestrição do DNA apresenta dificuldades de interpretação dos resultados dado o elevado número de bandas muito próximas que são geradas pela digestão do DNA cromossomal por endonucleases de restrição. O RAPD (*Randomly amplified polymorphic DNA*) é um método baseado na PCR cujas seqüências de DNA são escolhidas de forma randômica, porém o método tem baixa reprodutibilidade se não estiver bem padronizado (Farber, 1996).

As seqüências cromossômicas repetitivas são conhecidas nas bactérias Gram-negativas e são referidas como REP (*Repetitive extragenic palindromic*) e ERIC (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus*) e são também baseadas na PCR utilizadas para amplificação de seqüências de DNA cromossomal existentes entre esses

elementos repetidos, apesar de boa reprodutibilidade, apresenta apenas moderado poder discriminatório (Farber, 1996).

A tipagem PFGE é uma ferramenta molecular para estudos epidemiológicos, possui alta reprodutibilidade e poder discriminatório, pois utiliza a análise de macrorestrição, em que o DNA cromossomal (preparado em *plugs* de agarose) é digerido por endonucleases de corte infrequente que produzem um número pequeno de grandes fragmentos de DNA (10 a 800 kilobases), sendo necessário um equipamento com alternância de corrente para separá-los durante a eletroforese (Farber, 1996).

A eletroforese em gel de campo pulsado possibilitou a detecção de considerável diversidade genética quando foram utilizadas três enzimas de restrição para caracterizar 54 isolados de *Salmonella* Typhi obtidos no Chile. Neste estudo, a comparação de 2 grupos de isolados humanos, obtidos com 11 anos de diferença, indicou que certos clones foram compartilhados entre os grupos e persistiram por longo tempo relacionados à infecção no homem. Alguns destes clones também foram identificados em amostras de fezes e água de rio, provendo evidência epidemiológica entre reservatórios ambientais e infecção humana (Thong *et al.*, 1996). Um total de 60 isolados de *S. Senftenberg*, provenientes de atividades de vigilância em ambientes marinhos, foi caracterizado por PFGE. Os clones mais prevalentes persistiram no ambiente por mais de quatro anos, enfatizando a capacidade de adaptação e sobrevivência da *Salmonella* em ambientes aquáticos. O método utilizado demonstrou também a existência de clones, entre isolados de *S. Senftenberg* oriundos de amostras de água e de moluscos (Martinez-Urtaza & Liebana, 2005).

Martinez-Urtaza *et al.* (2004), estudando amostras de *S. Typhimurium* isoladas de ambientes marinhos identificaram um mesmo clone tanto por PFGE, quanto pela análise plasmidial. A resistência a múltiplos antibióticos foi detectada entre amostras de *S. Typhimurium* isoladas de frutos do mar, destacando a necessidade de monitorar *Salmonella* em ambientes marinhos utilizados para criação de moluscos.

O método PFGE foi útil na identificação de padrões genotípicos indistinguíveis entre isolados de *Salmonella* spp. de amostras humanas e de lodo coletadas em usinas de tratamento de esgoto na Suíça, evidenciando que os clones presentes em resíduos de esgoto poderiam ter sido eliminados nas fezes humanas, além disso, a multiresistência a antimicrobianos esteve presente em isolados de ambas as fontes (Sahlström *et al.*, 2006).

Refsum *et al.* (2002) realizaram um estudo molecular com 142 isolados de *S. Typhimurium* de aves selvagens, animais domésticos e de amostras ambientais. A análise por PFGE revelou alta similaridade genética entre as amostras de aves selvagens, apesar da maioria dos isolados de aves selvagens terem sido classificadas em diferentes subgrupos, o que indica a relação destes genótipos com um determinado hospedeiro. Demonstraram que passarinhos, gaivotas e pombos foram a principal fonte de infecção para o homem e animais domésticos, como também fonte de contaminação ambiental.

Um estudo de caracterização genotípica com PFGE determinou a existência de relação clonal entre cepas de *S. Typhimurium* de origem humana e de animais, evidenciando a ligação deste sorovar tanto com infecção em humanos quanto sua presença em diversos reservatórios animais. A maioria das cepas humanas e animais multiresistentes a antimicrobianos pertenciam a um mesmo genótipo e foram isoladas

de diferentes áreas e anos, o que demonstra a circulação deste genótipo entre as fontes analisadas (HY *et al.*, 2002).

O método PFGE revelou alta diversidade genética quando empregado para a tipagem de 85 isolados de *S. Typhimurium* obtidos de amostras de gado de diferentes localidades nos EUA (Fakhr *et al.*, 2005)./ Em outro estudo com 128 cepas de *S. Typhimurium* isoladas de alimentos, o método PFGE apresentou excelente habilidade discriminatória entre as cepas analisadas, caracterizadas por diferentes padrões de bandas, contudo, foi possível detectar um clone representado por isolados de *S. Typhimurium* obtidos de gado, porco, galinha, peru e produtos derivados (Foley *et al.*, 2006).

Ribeiro *et al.* (2007) avaliaram 54 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de salame industrializado no Paraná. *Salmonella* Panama foi o sorovar mais freqüente entre as amostras. A multiresistência a antimicrobianos também foi detectada. A análise por PFGE foi hábil em discriminar diferentes perfis de restrição, considerando a utilização de 2 endonucleases de restrição, que revelaram diversidade genética entre isolados da mesma fonte de contaminação alimentar. Lapuz *et al.* (2007) estudaram 33 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de fezes e vísceras (fígado, baço e intestino) de ratos (10 cepas), do ambiente de uma fazenda (2 cepas) e de uma fábrica processadora de ovos (7 cepas), obtidas com swab de solo, paredes e etc., de efluentes de água (7 cepas) dessa fábrica e de ovos (7 cepas) de uma fazenda de criação de galinhas, para determinar a ligação epidemiológica entre as mesmas. A análise por PFGE com enzima *Xba* I revelou um perfil comum entre as cepas. Já com a enzima *Bln* I observaram diferentes perfis genotípicos, porém, com considerável similaridade genética. Os resultados demonstraram a necessidade da utilização de mais de uma enzima de restrição, quando

da utilização do PFGE para tipagem genética, a fim de ampliar o poder discriminatório do método.

No Senegal, Stevens *et al.* (2008) avaliaram 78 isolados de *Salmonella* spp. obtidos a partir de amostras de carne de vaca de um abatedouro e vários açougues, com a finalidade de examinar as rotas de disseminação da *Salmonella* e suas fontes de contaminação. A tipagem por PFGE permitiu a definição de diferentes genótipos entre seis sorotipos analisados: *S. Bredeney*, *S. Muenster*, *S. Waycross*, *S. Corvallis* e *S. Kentucky*. Os resultados da análise por PFGE demonstraram grande diversidade genotípica entre os isolados em relação às fontes de contaminação. Não houve relação evidente entre os perfis genotípicos e os locais de origem das amostras de carne. No entanto, os isolados de açougue quanto os isolados do abatedouro apresentaram resistência a antimicrobianos.

A tipagem por PFGE e a análise plasmidial detectou baixa similaridade genética entre 37 isolados de *Salmonella* Weltevreden oriundos de frutos do mar. O maior grupo incluiu isolados de amostras de camarão (11 isolados), peixe (13 isolados), caranguejo (1 isolado), caracol (2 isolados) e mexilhão (1 isolado), contudo pequenos subgrupos de isolados representaram mais de um clone um clone (Ponce *et al.*, 2008).

1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico laboratorial da salmonelose é realizado pela coprocultura que visa o isolamento e identificação da *Salmonella*. As fezes, sem conservantes, devem ser encaminhadas ao laboratório em temperatura ambiente e processadas dentro de 2 horas após a coleta. Se não for possível, as fezes devem ser colocadas em um frasco contendo meio de transporte Cary & Blair ou salina glicerinada, mantidas em

temperatura ambiente ou na geladeira, e encaminhadas ao laboratório de análises clínicas. Quando se tratar de *swab* retal, deve-se umedecê-lo em salina estéril e inseri-lo no esfíncter retal fazendo movimentos rotatórios, e enviar ao laboratório no prazo de 30 minutos, conservando-os em caixa de isopor ou utilizando-se o meio de transporte Cary & Blair.

Nos casos de febre entérica, usualmente nas duas primeiras semanas de doença, deve ser realizada a hemocultura (Winn *et al.*, 2008).

Para o isolamento, utilizam-se os meios seletivos indicadores a seguir: ágar *Salmonella-Shigella-SS*, ágar xilose-lisina-desoxicolato-XLD, Agar Verde Brilhante- VB. Para enriquecimento das amostras podem ser utilizadas Tetracionato, Selenito cistina e Rapaport-Vassiliadis. A incubação dos meios de cultura é realizada geralmente à 37°C por 18-24h. As colônias típicas do gênero *Salmonella*, nos meios seletivos- indicadores (XLD ou VB) são selecionadas para a identificação presuntiva usando o TSI (ágar tríplice açúcar-ferro), LIA (ágar lisina-ferro), EPM/Miili, Rugai modificado (IAL), seguido da caracterização bioquímica conclusiva utilizando testes bioquímicos na forma clássica convencional que consiste na utilização de meios sólidos e líquidos com diferentes substratos. Essa forma de identificação inclui provas de utilização de carboidratos (glicose, lactose, sacarose, manitol e maltose), prova de produção de indol, prova do vermelho-de-metila, prova de Voges-Proskauer, prova da utilização do citrato, prova de redução de nitratos, motilidade, prova de produção de urease, prova de produção de fenilalanina desaminase, atividade de citocromo oxidase e prova da descarboxilação dos aminoácidos (lisina, arginina e ornitina) (Ewing, 1986), a identificação bioquímica também pode ser realizada por método automatizado (Vitek 2), seguindo as recomendações do fabricante (bioMèrieux).

Quando se trata de alimentos ou diferentes tipos de água, utiliza-se um pré-enriquecimento em água peptonada tamponada-APT (pH 7.0) e posterior inoculação nos meios de enriquecimento (Selenito cistina ou Rappaport-Vassiliadis) a 42,5° C (Loureiro, 2007).

A identificação antigênica através da pesquisa dos antígenos somáticos e/ou flagelares é necessária para selar o diagnóstico etiológico de *Salmonella*, o qual é realizado através do teste de aglutinação rápida em lâmina, utilizando-se anti-soros específicos polivalente somático (A-I) e polivalente flagelar (a-z), disponíveis comercialmente (Ewing, 1986). A identificação dos sorovares de *Salmonella* no Brasil, é realizada em laboratórios de referência nacional (Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ e Instituto Adolfo Lutz).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Caracterizar genotipicamente e fenotipicamente *Salmonella* Panama isoladas de ambientes aquáticos, amostras humanas, alimentos e animais silvestres, em diferentes municípios do Estado do Pará.

1.5.2 Objetivos específicos

- Definir os modelos de resistência a antimicrobianos das amostras de *Salmonella* Panama das diferentes fontes;
- Verificar a ocorrência de clones de *Salmonella* Panama provenientes de amostras de águas superficiais de Belém, Moju, Barcarena e Floresta Nacional de Caxiuanã/Melgaço, de águas subterrâneas de Moju, Barcarena e Anajás e de amostras de águas de esgoto de Belém;
- Descrever a ocorrência de clones de *Salmonella* Panama entre isolados de humanos, alimentos e animais silvestres e compará-los aos perfis genotípicos dos isolados ambientais;
- Comparar os perfis de resistência aos antimicrobianos com os diferentes perfis de PFGE obtidos entre as amostras de *Salmonella* Panama isoladas em ambientes aquáticos de áreas protegidas (Floresta Nacional de Caxiuanã) e aquelas oriundas de áreas com ação antrópica evidente.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MODELO DE ESTUDO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Um total de 110 isolados de *Salmonella enterica* sorovar Panama foram avaliados, correspondendo a 84 isolados de origem ambiental, 16 isolados clínicos humanos de casos de gastroenterite, 5 isolados de alimentos e 5 de animais silvestres (Quadro 3). Os isolados ambientais de *Salmonella* Panama selecionados para o presente estudo foram obtidos durante monitoramento ambiental da *Salmonella* em diferentes ecossistemas aquáticos, realizado no Instituto Evandro Chagas (IEC) (Loureiro, 2007), em diferentes ambientes aquáticos no Estado do Pará, no período de 1994 e 2001 (Quadro 4 e 5 e Figura 1). As 16 amostras humanas de *Salmonella* Panama incluídas neste estudo foram isoladas de casos de diarreia aguda, no Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas da Seção de Bacteriologia do IEC, dentre estas, 12 amostras foram isoladas no período de 1975 a 2007 de espécimes fecais de pacientes provenientes de Belém-PA durante atividades de rotina, enquanto as outras 4, foram isoladas entre 2007 e 2008 de pacientes atendidos durante um projeto de pesquisa desenvolvido pelo IEC no município de Juruti-PA. Todas as amostras de alimentos (carne bovina moída) foram isoladas em 1997, em Ananindeua-Pa, e as de animais silvestres, foram provenientes de animais capturados nas matas do município de Parauapebas-PA, em 2008.

Quadro 3 – Distribuição numérica das amostras de *Salmonella* Panama em relação à fonte, município e ano de isolamento

Fonte	Município	Nº de amostras <i>Salmonella</i> Panama	Ano
Isolados Ambientais	Belém, Mojú, Barcarena, Anajás e Melgaço – PA	84	1994-2001
Isolados Humanos	Belém Juruti – PA	12 4	1975-2007 2007-2008
Isolados de Alimentos	Ananindeua – PA	5	1997
Isolados de Animais Silvestres	Parauapebas – PA	5	2008

Quadro 4 - Distribuição do número de amostras ambientais de *Salmonella* Panama em relação aos pontos de amostragem no município de Belém, Pará

Origem	Nº de amostras de <i>Salmonella</i> Panama
Água superficial:	
Ig. Tucunduba	4
Ig. Paracuri	11
Ig. Combu	6
Baía do Guajará	4
Rio Guamá	2
Praia do Paraiso (Mosqueiro)	1
Esgoto:	
Terminal Rodoviário de Belém	1
Afluente da Estação de Tratamento de esgoto do Una	7
Aeroporto Internacional de Belém	1
Total	37

Quadro 5- Distribuição do número de amostras ambientais de *Salmonella* Panama em relação aos seus pontos de origem na Floresta Nacional de Caxiuanã/Melgaço, Pará

Origem	Nº de amostras de <i>Salmonella</i> Panama
Água superficial:	
Ig. Aricurú	10
Ig. Grande	5
Ig. Retiro	5
Ig. Açacu	2
Ig. Arauá	4
Ig. Campinho	1
Ig. Curuazinho	4
Ig. Curuá	4
Total	35



Figura 1 - Imagens geoprocessadas dos pontos de amostragem na Estação Científica Ferreira Penna, Floresta Nacional de Caxiuanã, Melgaço, Pará (Fonte: Loureiro, 2007).

• pontos de coleta

2.2 MÉTODOS LABORATORIAIS

2.2.1 Reisolamento, identificação e manutenção das culturas de *Salmonella* Panama

Os 110 isolados de *Salmonella enterica* sorovar Panama mantidas na bacterioteca do IEC, foram repicadas para caldo TSB (caldo de soja tripticaseína-Difco) e semeadas em agar *Salmonella-Shigella* (SS). A partir do crescimento obtido, foram selecionadas duas colônias e repicadas para TSI. Posteriormente foi realizada a

identificação bioquímica e sorológica (Ewing, 1986). Um inóculo de cada amostra foi repicado e mantido em ágar Luria (Difco) na temperatura ambiente e em caldo Luria com 15% de glicerol e armazenado a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.2 Análise de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos

A sensibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados *Salmonella* Panama foi avaliada utilizando 25 drogas antimicrobianas. O procedimento foi desenvolvido por 2 métodos. O método de difusão, pelo sistema de disco, de acordo com Bauer *et al.* (1966) foi utilizado para complementar com mais 5 antimicrobianos a relação dos agentes selecionados, e pelo sistema automatizado Vitek 2 (bioMérieux), em que se utilizou cartão com 20 antimicrobianos, obedecendo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* (2009).

Cada isolado de *S. Panama* foi repicado para tubo com caldo Müller Hinton (5 mL) e incubado a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após crescimento bacteriano, foi colhido um inóculo e semeado em placa com ágar nutriente (Difco) para obtenção de colônias isoladas. Após 24 horas ($35\text{ }^{\circ}\text{C}$), foram repicadas 5 colônias para tubos com caldo Mueller Hinton (5 mL) e incubados a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para obtenção do inóculo foi utilizado um turbidímetro para ajustar o inóculo ao padrão de turbidez de 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

No método de difusão de disco em ágar, foram utilizados discos com os antimicrobianos nas concentrações conforme especificado a seguir: cloranfenicol-C (30 μg), estreptomicina-S (10 μg), cefotaxima-CTX (30 μg), imipenem-I (10 μg) e trimetoprim-T (5 μg). O inóculo padronizado foi semeado uniformemente na superfície do meio ágar Müller Hinton utilizando um *swab* descartável logo após, os discos foram aplicados sobre o meio com auxílio de um distribuidor, em seguida foram incubados a

35 °C. Após 18-24h de incubação, realizou-se a leitura do diâmetro do halo de inibição utilizando um paquímetro digital e a interpretação da sensibilidade foi baseada nas recomendações do CLSI (2009).

Para utilização do método automatizado Vitek 2 (bioMérieux), inicialmente o inóculo padronizado foi transferido para o cartão contendo os antibióticos diluídos (AST-GN05) no módulo de preenchimento do equipamento, em seguida, o cartão foi selado e colocado no módulo de incubadora e leitura. Os resultados foram determinados por detecção eletro-ótica do crescimento microbiano dentro dos poços dos cartões do teste. As concentrações mínimas inibitórias (CIM) foram determinadas por análise estatística das médias de crescimento bacteriano na presença de agentes antimicrobianos.

O cartão AST-GN05 contém os seguintes antimicrobianos nas referidas concentrações: Ácido nalidíxico-NAL (8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL); amoxicilina/ácido clavulânico-AMC (4/2 µg/mL, 16/8 µg/mL, 32/16 µg/mL); ampicilina-AM (4 µg/mL, 8 µg/mL, 32 µg/mL); cefalotina-CF (2 µg/mL, 8 µg/mL, 32 µg/mL); cefazolina- CZ (4 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL); cefoxitina-CX (8 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL); cefpodoxima-CPD (0,5 µg/mL, 1 µg/mL, 4 µg/mL); ceftazidima-CAZ (1 µg/mL, 2 µg/mL, 8 µg/mL, 32 µg/mL); ceftriaxona-CTR (1 µg/mL, 2 µg/mL, 8 µg/mL, 32 µg/mL); cefuroxima-CFX (2 µg/mL, 8 µg/mL, 32 µg/mL); ciprofloxacina-CIP (0,5 µg/mL, 2 µg/mL, 4 µg/mL); gentamicina-GM (4 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL); levofloxacina-LEV (0,5 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL); nitrofurantoína-NIT (16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL); norfloxacina-NOR (1 µg/mL, 8 µg/mL, 32 µg/mL); tetraciclina-TE (2 µg/mL, 4 µg/mL, 8 µg/mL); ticarcilina-TC (16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL), ticarcilina-ácido clavulânico-TIM (8/2 µg/mL, 32/2 µg/mL, 64/2 µg/mL);

tobramicina-TO (8 µg/mL, 16 µg/mL, 64 µg/mL) e trimetoprim-sulfametoxazol-STX (0,5/9,5 µg/mL, 2/38 µg/mL, 16/304 µg/mL).

O controle de qualidade da potência dos antimicrobianos foi procedida utilizando as cepas padrões de *Escherichia coli* ATCC-25.922 e *Escherichia coli* ATCC35.218.

2.2.3 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

O DNA genômico foi preparado conforme descrito por Teixeira *et al.* (1997) e Fonseca *et al.* (2006), com algumas modificações:

PREPARAÇÃO DOS PLUGS DE AGAROSE COM DNA BACTERIANO

- Os isolados de *Salmonella* Panama foram semeados em placas com ágar BHI para obtenção de colônias isoladas e incubados em estufa à 37 °C por 24 horas;
- A partir do crescimento bacteriano, foram repicadas duas colônias para 5 mL de caldo BHI;
- Seguiu-se a incubação em banho-maria a 40 °C sob agitação até atingir turvação compatível a escala 1 de Mc Farland, geralmente obtida em 2 horas;
- Em seguida, transferiu-se 1,5 mL do caldo para microtubo e centrifugou-se por 2 minutos a 8.000 r.p.m. A centrifugação foi repetida até formação de precipitado considerável;
- Ao precipitado foi adicionado 300 µL de solução salina a 0,85% o qual foi ressuspenso, em seguida foi adicionado 300 µL de agarose Nusieve GTG a 2%, e foi ressuspenso novamente;
- A mistura foi aplicada em molde para formação de plugs de agarose e mantida à - 4 °C por 10 minutos;

- Em seguida, os plugs foram transferidos dos moldes para tubos com tampa, contendo 2 mL de tampão de lise celular (NaCl 1 M, Tris-HCl 6 mM pH 7.6, EDTA 100 mM pH 8.0, Brij 58 a 0,5%, desoxicolato de sódio 0,2%, sarcosina 0,5%) acrescentado de 1 mg de lisozima por mL;
- Os tubos foram incubados em estufa à 37 °C por 15 a 24 h;
- Removeu-se o tampão de lise celular e foi adicionado 3,5ml de solução ESP (EDTA 0,5 pH 8.0, sarcosina 1%) previamente preparada com uma concentração final de proteinase k de 0,1 mg/mL;
- Incubou-se em banho-maria entre 50 °C e 54 °C por 18 à 24 h;
- A solução ESP com proteinase k foi removida e os plugs foram transferidos para tubos com 50 mL de TE (Tris 10 mM, EDTA 0,1 mM);
- Os tubos foram dispostos em equipamento para lavagem com rotação por 24h;
- Em seguida os plugs foram submetidos a 4 lavagens com TE em intervalos de 3h, após cada lavagem foram submetidos à rotação.

DIGESTÃO DO DNA CROMOSSOMAL COM ENDONUCLEASE DE RESTRIÇÃO

- Foram transferidos 3 *plugs* por amostra para microtubos de 1,5 mL ;
- Adicionou-se 200µL da solução de digestão contendo 30U/amostra da endonuclease de restrição *Spe I*;
- As amostras foram submetidas à incubação em estufa a 37 °C por 24 h.

CORRIDA ELETROFORÉTICA

Os *plugs* com DNA cromossomal digerido pela enzima *Spe I* foram fundidos a 80 °C em banho seco e aplicados em gel de agarose a 1% (agarose para

corrida PFG Bio-Rad) preparado com 100 mL de Tris-boreto-EDTA (TBE). O gel foi em seguida submerso em 2400 mL de TBE diluído 5 vezes, contido na câmara eletroforética. A cepa padrão H9812 de *Salmonella* Braenderup foi utilizada como controle em cada gel. Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese usando o equipamento CHEFF DRIII (Bio-Rad, Hercules, CA) com recirculação do TBE a 14 °C. A corrida procedeu nos seguintes parâmetros: Tempo de corrida, 24 h; gradiente de voltagem, 6 V/cm; tempo de pulso inicial, 5 s; tempo de pulso final, 30 s; ângulo de inclusão, 120°. O gel foi corado por uma hora em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob luz ultravioleta.

MÉTODO DE ANÁLISE

No presente estudo, para a avaliação dos perfis de restrição das amostras de *S. Panama* foi utilizado o programa Bionumerics versão 5.1. Como método de análise utilizou-se UPGMA (*Unweight Pair Group Arithmetic Averages*) e coeficiente de Dice.

2.2.4 Aspectos Éticos

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos (CEP) e Comitê de Ética em Pesquisa com Animais (CEPAN), do Instituto Evandro Chagas, com os registros nº 017/2009 (CAAE:009.0.072.000-09) e nº 034/2009, respectivamente.

3 RESULTADOS

As 110 amostras de *Salmonella* Panama analisadas apresentaram multirresistência a pelo menos 5 antibióticos. O modelo de resistência mais freqüente abrangeu 85 (77,3%) das amostras de *Salmonella* Panama, incluindo 63 amostras de origem ambiental, 16 amostras de origem humana, 5 amostras de alimentos e 1 amostra de animal silvestre. Esse modelo de resistência foi representado pelos antibióticos cefalotina, cefazolina (ambos cefalosporinas de 1ª geração), cefuroxima, cefoxitina (ambos cefalosporinas de 2ª geração), gentamicina e tobramicina (ambos aminoglicosídeos) (Tabela 1).

O segundo modelo de resistência mais observado totalizou 12,7% (14 isolados) e foi detectado em 10 isolados de *Salmonella* Panama de origem ambiental e 4 isolados de animal silvestre. Esse modelo correspondeu aos antibióticos cefalotina, cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, gentamicina, tobramicina e estreptomicina. O modelo de resistência menos freqüente incluindo cefalotina, cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, gentamicina, tobramicina e imipenem foi encontrado em apenas 1 (0,9%) isolado de *Salmonella* Panama de origem ambiental. Do total de isolados pesquisados, somente 10 (9,1%) isolados de *Salmonella* Panama de origem ambiental apresentaram o modelo de resistência representado por cefalotina, cefazolina, cefuroxima, gentamicina e tobramicina (Tabela 1)

Tabela 1- Distribuição da frequência dos modelos de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* Panama de acordo com suas fontes, nos anos de 1997 a 2001, 2008, 1975 a 2007.

Modelos de Resistência ^a	Isolados Ambientais	Isolados de Animais	Isolados de Alimentos	Isolados Humanos	Total de Isolados n (%)
CF-CZ-CFX-GM-TO	10	0	0	0	10 (9,1%)
CF-CZ-CFX-CX-GM-TO	63	1	5	16	85 (77,3%)
CF-CZ-CFX-CX-GM-TO-S	10	4	0	0	14 (12,7%)
CF-CZ-CFX-CX-GM-TO-I	1	0	0	0	1 (0,9%)
Total	84	5	5	16	110 (100%)

^aCF- cefalotina; CZ- cefazolina; CFX- cefuroxima; CX- cefoxitina; GM- gentamicina; TO- tobramicina; S- estreptomicina; I- imipenem.

Os isolados humanos de *S. Panama* (n=16) os 5 isolados de *S. Panama* de animal silvestre oriundos de Parauapebas e 5 isolados de *S. Panama* de alimentos advindos de Belém foram 100% multirresistentes à cefalotina, cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, gentamicina e tobramicina. Apenas 4 dos 5 isolados de *S. Panama* de animais silvestres demonstraram resistência à estreptomicina (Tabela 2).

Nas amostras ambientais de *S. Panama* (n=84) observou-se 100% de resistência à cefalotina, cefazolina, cefuroxima, gentamicina e tobramicina, seguido de 91,7% das amostras ambientais de *S. Panamá* (n=77) resistentes à cefoxitina, 10 (11,9%) amostras ambientais de *S. Panama* resistentes à estreptomicina e 1 (1,2%) amostra ambiental de *S. Panama* resistente ao imipenem (Tabela 3).

Tabela 2- Distribuição da frequência de resistência aos antimicrobianos das amostras de alimentos, animais e humanas de *Salmonella* Panama relacionadas ao município de origem, nos anos de 1975 a 2008.

Amostras	Município	Total de Amostras Analisadas	Amostras Multirresistentes n (%)	Marcos de Resistência ^a						
				CF	CZ	CFX	CX	GM	TO	S
Alimentos	Belém	5	5 (100)	5	5	5	5	5	5	0
Animais	Parauapebas	5	5 (100)	5	5	5	5	5	5	4
Humanas	Belém	12	12 (100)	12	12	12	12	12	12	0
	Juruti	4	4 (100)	4	4	4	4	4	4	0
Total		26	26 (100)	26	26	26	26	26	26	4

^aCF- cefalotina; CZ- cefazolina; CFX- cefuroxima; CX- cefoxitina; GM- gentamicina; TO- tobramicina; S- estreptomicina

Tabela 3- Distribuição da frequência de resistência aos antimicrobianos das amostras ambientais de *Salmonella* Panama associados à fonte e município de origem, nos anos de 1994 a 2001.

Amostras Ambientais	Município	Fonte	Total de Amostras Analisadas	Marcos de Resistência ^a							
				CF n ^b (%)	CZ n (%)	CFX n (%)	CX n (%)	GM n (%)	TO n (%)	S n (%)	I n (%)
Águas Superficiais	Melgaço	Igarapé	35	35 (50,7)	35 (50,7)	35 (50,7)	32 (46,4)	35 (50,7)	35 (50,7)	2 (2,9)	0 (0,0)
	Belém	Igarapé	21	21 (30,4)	21 (30,4)	21 (30,4)	21 (30,4)	21 (30,4)	21 (30,4)	4 (5,8)	1 (1,4)
		Baía	4	4 (5,8)	4 (5,8)	4 (5,8)	4 (5,8)	4 (5,8)	4 (5,8)	1 (1,4)	0 (0,0)
		Rio	2	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Praia	1	1 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)	1 (1,4)	0 (0,0)
	Barcarena	Igarapé	2	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	0 (0,0)	2 (2,9)	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
		Rio	2	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	1 (1,4)	0 (0,0)
	Mojú	Igarapé	2	2 (2,9)	2 (2,9)	2 (2,9)	0 (0,0)	2 (2,9)	2 (2,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
Subtotal			69	69 (100)	69 (100)	69 (100)	65 (94,2)	69 (100)	69 (100)	9 (13,0)	1 (1,4)

(continua)

Tabela 3- Distribuição da frequência de resistência aos antimicrobianos das amostras ambientais de *Salmonella* Panama associados à fonte e município de origem, nos anos de 1994 a 2001.

Amostras Ambientais	Município	Fonte	Total de Amostras Analisadas	Marcos de Resistência ^a							
				CF n ^b (%)	CZ n (%)	CFX n (%)	CX n (%)	GM n (%)	TO n (%)	S n (%)	I n (%)
Água	Anajás	Poço	2	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Subterrânea	Barcarena	Poço	2	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	2 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Mojú	Poço	2	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	0 (0,0)	2 (33,3)	2 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Subtotal			6	6 (100)	6 (100)	6 (100)	3 (50)	6 (100)	6 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)
Água de Esgoto	Belém	Esgoto	9	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	1 (11,1)	0 (0,0)
Subtotal			9	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	9 (100)	1 (11,1)	0 (0,0)
Total			84	84 (100)	84 (100)	84 (100)	77 (91,7)	84 (100)	84 (100)	10 (11,9)	1 (1,2)

^aCF- cefalotina; CZ- cefazolina; CFX- cefuroxima; CX- ceftoxitina; GM- gentamicina; TO- tobramicina; S- estreptomicina; I- imipenem.^b

n- número de amostra

Em águas superficiais, a multirresistência à cefalotina, cefazolina, cefuroxima, gentamicina e tobramicina abrangeu as amostras ambientais de *S. Panama* obtidas nos municípios de Melgaço (35 amostras), Belém (28 amostras), Barcarena (4 amostras) e Mojú (2 amostras). As 32 amostras (46,4%) de *S. Panama* provenientes de Melgaço, 28 amostras de Belém, dentre estas, 21 amostras (30,4%) de igarapé, 4 amostras (5,8%) de baía, 2 amostras (2,9%) de rio e 1 amostra (1,4%) de praia, além de 2 amostras (2,9%) de rio de Barcarena foram resistentes à cefoxitina. A resistência à estreptomicina foi detectada em 2 amostras (2,9%) de *S. Panama* de igarapé de Melgaço, em 6 amostras de *S. Panama* de Belém, dentre estas, 4 amostras (5,8%) de igarapé, 1 amostra (1,4%) de baía e 1 amostra (1,4%) de praia, além de 1 amostra (1,4%) de *S. Panama* de rio de Barcarena. Entre as 84 amostras ambientais de *Salmonella Panama* analisadas somente 1 amostra (1,4%) de igarapé de Belém demonstrou resistência ao imipenem (Tabela 3).

A multirresistência à cefalotina, cefazolina, cefuroxima, gentamicina e tobramicina também foi observada em isolados de *S. Panama* de água subterrânea advindas de Anajás, 2 amostras (33,3%), de Barcarena, 2 amostras (33,3%) e de Mojú, 2 amostras (33,3%). A resistência à cefoxitina foi detectada nas 2 amostras (33,3%) de *S. Panama* de água subterrânea de Anajás e em 1 amostra (16,7%) de *S. Panama* de água subterrânea de Barcarena. As amostras ambientais de *S. Panama* de água de esgoto em Belém (9 amostras) foram multirresistentes à cefalotina, cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, gentamicina e tobramicina, dentre estes apenas 1 amostra (11,1%) foi resistente à estreptomicina (Tabela 3).

No município de Melgaço, a resistência à estreptomicina foi detectada em apenas 2 dos 4 isolados ambientais de *S. Panama* provenientes do igarapé

Curuazinho na Floresta Nacional de Caxiuanã. Entre os isolados de *S. Panama* obtidos a partir de águas superficiais de Belém, a resistência à estreptomicina foi observada em 1 das 4 amostras de *S. Panama* oriundas do igarapé Paracuri (Paracuri106), em 3 amostras de *S. Panama* isoladas do igarapé Combu (Combu114), em 1 das 4 amostras de *S. Panama* obtidas a partir da baía do Guajará e em 1 amostra de *S. Panama* proveniente da praia Paraíso na ilha do Mosqueiro. A resistência à estreptomicina foi também observada em 1 das 2 amostras de *S. Panama* provenientes do rio Mucurycá em Barcarena. Nas águas de esgoto do município de Belém apenas 1 amostra de *S. Panama* oriunda do esgoto do Aeroporto apresentou resistência à estreptomicina (Tabela 4).

A maioria das amostras ambientais de *S. Panama* avaliadas apresentaram resistência à cefoxitina, com exceção de 2 amostras de *S. Panama* advindas do igarapé Açacu em Melgaço, 2 amostras de *S. Panama* do igarapé Igarabar em Barcarena, 2 amostras de *S. Panama* do igarapé Levy em Mojú, 2 amostras de *S. Panama* de água subterrânea do poço de uma escola em Mojú e 1 amostra de *S. Panama* obtida a partir de água de poço no município de Barcarena, ressalta-se que 1 amostra de *S. Panama* de água de poço oriunda desta mesma fonte em Barcarena foi resistente à cefoxitina (Tabela 4).

Os resultados do teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de Bauer *et al.* (1966), aplicado a 110 amostras de *Salmonella Panama*, revelaram que 65 amostras ambientais, 13 humanas, 4 de alimentos e 1 de animal silvestre foram intermediários à estreptomicina, além disso 31 amostras ambientais de *Salmonella Panama* foram intermediários à cefotaxima pelo mesmo método.

Tabela 4- Distribuição da frequência de resistência aos antimicrobianos das amostras ambientais de *Salmonella* Panama relacionadas à fonte, nome da fonte e município de origem, nos anos de 1994 a 2001.

Fonte	Município ^a	Nome da Fonte	Total de Amostras Analisadas	Amostras Multiresistentes n (%)	Marcos de Resistência ^b							
					CF	CZ	CFX	CX	GM	TO	S	I
Igarapé	Mel	Aricuru	10	10 (100)	10	10	10	10	10	10	0	0
	Mel	Grande	5	5 (100)	5	5	5	5	5	5	0	0
	Mel	Retiro	5	5 (100)	5	5	5	4	5	5	0	0
	Mel	Araúá	4	4 (100)	4	4	4	4	4	4	0	0
	Mel	Curuá	4	4 (100)	4	4	4	4	4	4	0	0
	Mel	Curuazinho	4	4 (100)	4	4	4	4	4	4	2	0
	Mel	Açacu	2	2 (100)	2	2	2	0	2	2	0	0
	Mel	Campinho	1	1 (100)	1	1	1	1	1	1	0	0
	Bel	Paracuri1 ^c	4	4 (100)	4	4	4	4	4	4	0	0
Bel	Paracuri3 ^c	3	3 (100)	3	3	3	3	3	3	0	0	

(continua)

Tabela 4- Distribuição da frequência de resistência aos antimicrobianos das amostras ambientais de *Salmonella* Panama relacionadas à fonte, nome da fonte e município de origem, nos anos de 1994 a 2001.

(continuação)

Fonte	Município ^a	Nome da Fonte	Total de Amostras Analisadas	Amostras Multiresistentes n (%)	Marcos de Resistência ^b							
					CF	CZ	CFX	CX	GM	TO	S	I
Igarapé	Bel	Paracuri106 ^d	4	4 (100)	4	4	4	4	4	4	1	1
	Bel	Combu21 ^d	3	3 (100)	3	3	3	3	3	3	0	0
	Bel	Combu114 ^d	3	3 (100)	3	3	3	3	3	3	3	0
	Bel	Tucunduba	4	4 (100)	4	4	4	4	4	4	0	0
	Barc	Igarabar	2	2 (100)	2	2	2	0	2	2	0	0
	Mo	Levy	2	2 (100)	2	2	2	0	2	2	0	0
Baía	Bel	Guajará	4	4 (100)	4	4	4	4	4	4	1	0
Rio	Bel	Guamá	2	2 (100)	2	2	2	2	2	2	0	0
	Barc	Mucurycá	2	2 (100)	2	2	2	2	2	2	1	0

(continua)

Tabela 4- Distribuição da frequência de resistência aos antimicrobianos das amostras ambientais de *Salmonella* Panama relacionadas à fonte, nome da fonte e município de origem, nos anos de 1994 a 2001.

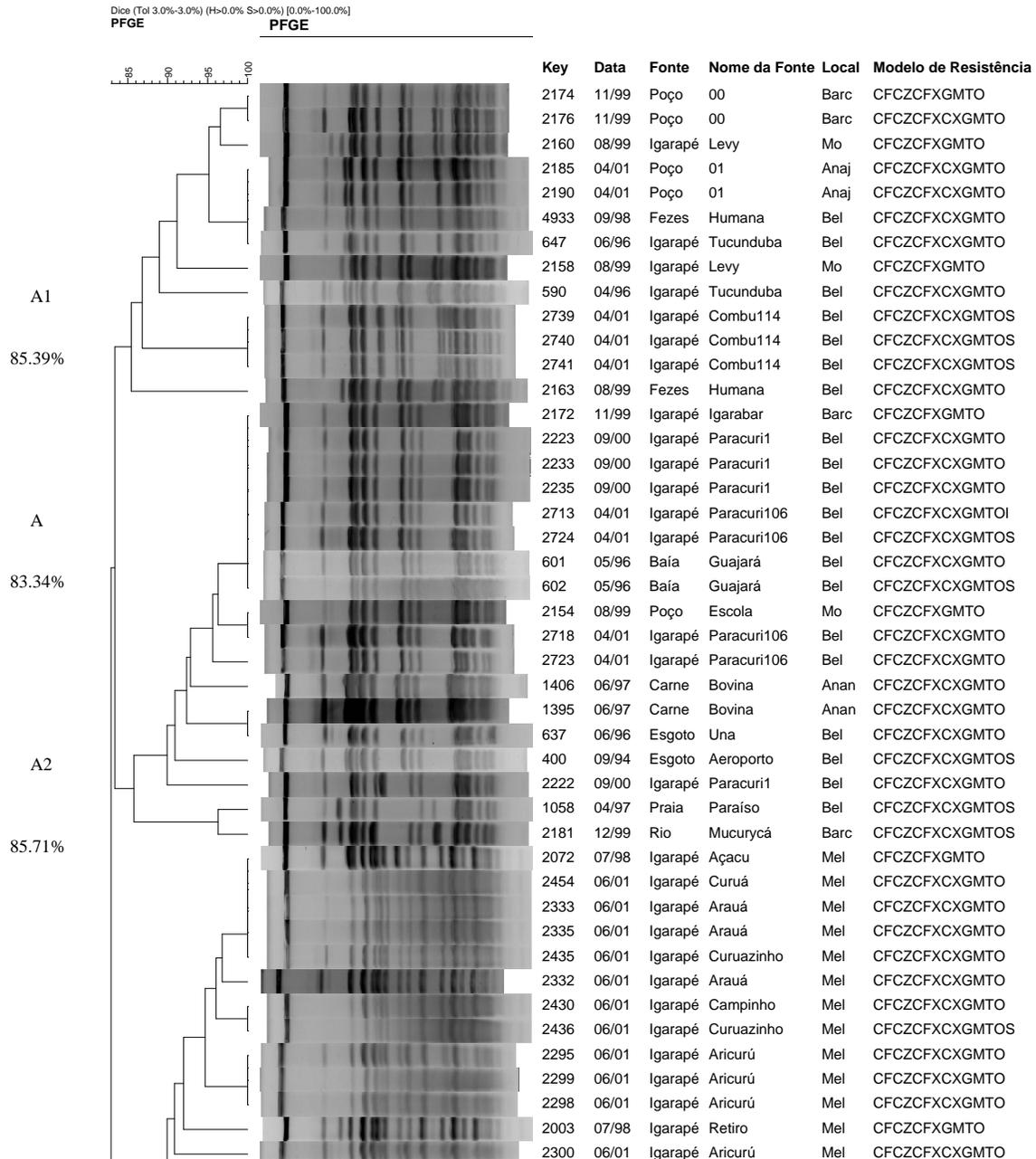
(continuação)

Fonte	Município ^a	Nome da Fonte	Total de Amostras Analisadas	Amostras Multiresistentes n (%)	Marcos de Resistência ^b							
					CF	CZ	CFX	CX	GM	TO	S	I
Praia	Bel	Paraíso	1	1 (100)	1	1	1	1	1	1	1	0
Poço	Anaj	01 ^e	2	2 (100)	2	2	2	2	2	2	0	0
	Barc	00 ^e	2	2 (100)	2	2	2	1	2	2	0	0
	Mo	Escola	2	2 (100)	2	2	2	0	2	2	0	0
Esgoto	Bel	Una	7	7 (100)	7	7	7	7	7	7	0	0
	Bel	Aeroporto	1	1 (100)	1	1	1	1	1	1	1	0
	Bel	Terminal	1	1 (100)	1	1	1	1	1	1	0	0
Total			84	84 (100)	84	84	84	77	84	84	10	1

^aMel- Melgaço; Bel- Belém; Barc- Barcarena; Mo- Mojú; Anaj- Anajás. ^bCF- cefalotina; CZ- cefazolina; CFX- cefuroxima; CX- cefoxitina; GM- gentamicina; TO- tobramicina; S- estreptomicina; I- imipenem. ^cParacuri1 e Paracuri3 referem-se aos pontos de coleta no igarapé Paracuri. ^dParacuri106 refere-se a uma amostra de água coletada na extensão do igarapé Paracuri; Combu21 e Combu114 são amostras de água coletadas na extensão do igarapé Combu. ^e01 e 00 são poços residenciais.

Um total de 110 isolados de *Salmonella* Panama foi submetido à tipagem por PFGE com a enzima de restrição *Spe* I, e resultou em 54 perfis genotípicos diferentes, dentre estes foi observada a ocorrência de 16 clones. Apenas 89 isolados obtiveram caracterização genotípica, pois o DNA cromossômico dos demais isolados degradou quando testados pelo protocolo PFGE adotado. O dendograma (Figura 2), gerado pelo programa Bionumerics versão 5.1 mediante o método de análise UPGMA (*Unweight Pair Group Method Arithmetic Averages*) com coeficiente de Dice, revelou a existência de 2 grandes grupos entre as 89 amostras de *Salmonella* Panama, designados grupo A e grupo B, definidos com uma similaridade genética de 83,34% e 83,87%, respectivamente.

O grupo A se subdividiu em dois subgrupos: subgrupo A1, identificado com 85,39% de similaridade entre os isolados, e subgrupo A2, definido com 85,71% de similaridade. No subgrupo A1, que reuniu 13 isolados de *Salmonella* Panama, foram detectados 7 perfis genotípicos e observada a ocorrência de 3 clones. Um clone agrupou 2 isolados (2174 e 2176) de água de poço da mesma fonte no município de Barcarena, outro clone correspondeu a 2 isolados (2185 e 2190) de água de poço da mesma fonte no município de Anajás, um isolado (4933) de origem humana do município de Belém e um isolado ambiental (647) do igarapé Tucunduba, um terceiro clone do subgrupo A1 foi representado por 3 isolados ambientais (2739, 2740 e 2741) provenientes do igarapé Combu (Combu114).



(continua)

Figura 2 - Dendrograma dos perfis de restrição PFGE de 89 isolados de *Salmonella* Panama, produzidos pela enzima *Spe* I, e gerado pelo programa Bionumerics versão 5.1, utilizando método de análise UPGMA e coeficiente de Dice.

(continuação)

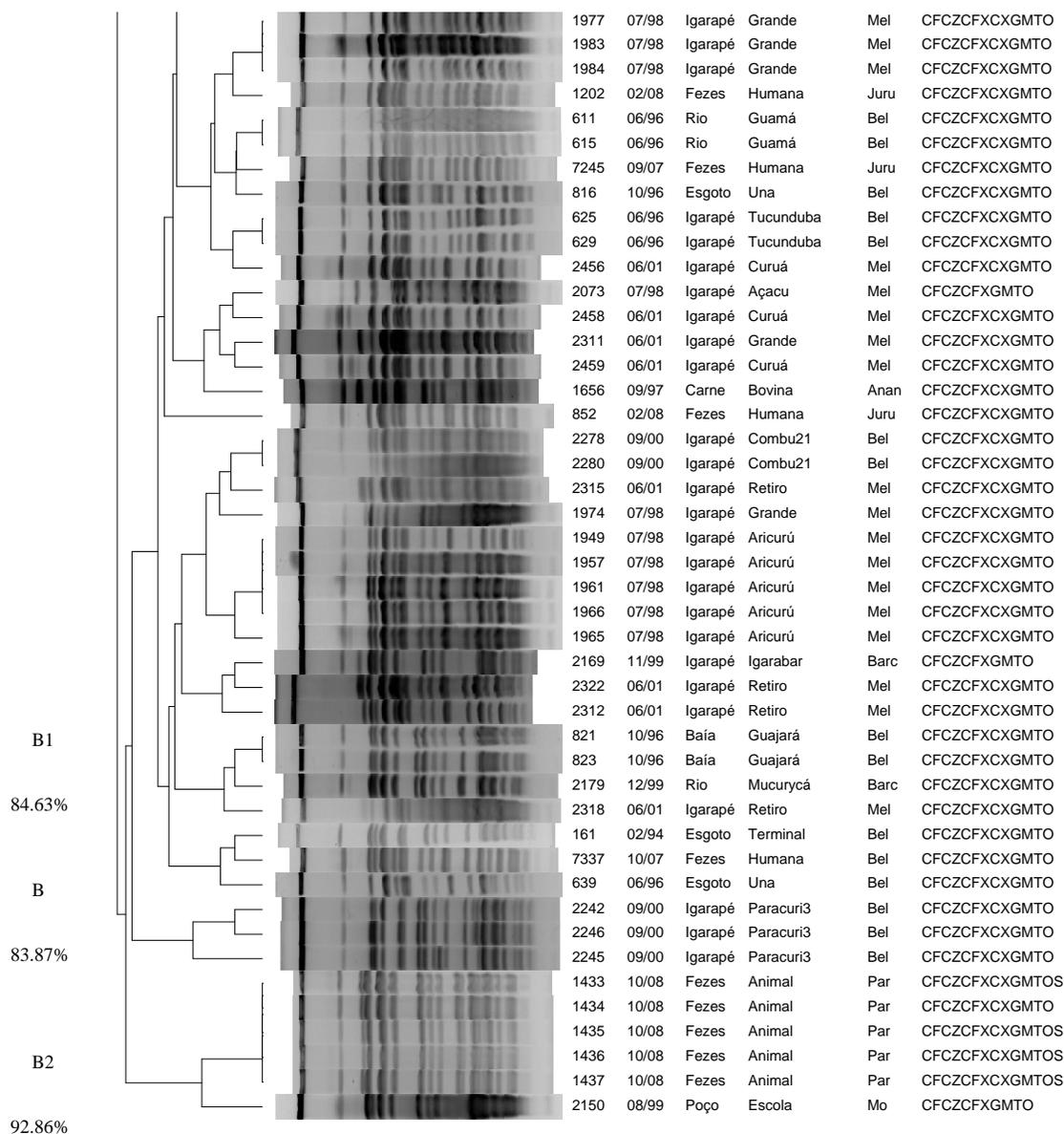


Figura 2 – Dendrograma dos perfis de restrição PFGE de 89 isolados de *Salmonella* Panama, produzidos pela enzima *Spe* I, e gerado pelo programa Bionumerics versão 5.1, utilizando método de análise UPGMA e coeficiente de Dice.

Salienta-se que na Figura 2, a direita na coluna a identificação 00 e 01 correspondem ao nome da fonte que são poços residenciais; Paracuri1 e Paracuri3 referem-se aos pontos de coleta no igarapé Paracuri, e Paracuri106 refere-se a uma

amostra de água coletada no igarapé Paracuri; Combu21 e Combu114 referem-se a amostras de água coletadas no igarapé Combu. Em local, as abreviações correspondem a: Mel- Melgaço; Bel- Belém; Barc- Barcarena; Mo- Mojú; Anaj- Anajás. Os modelos de resistência correspondem a: CF- cefalotina; CZ- cefazolina; CFX- cefuroxima; CX- cefoxitina; GM- gentamicina; TO- tobramicina; S- estreptomicina; I- imipenem.

O subgrupo A2, composto por 18 isolados de *Salmonella* Panama, apresentou 9 perfis genotípicos distintos com a ocorrência de 3 clones, o maior clone com 8 isolados e, portanto, o clone mais freqüente entre os isolados de *S. Panama* avaliados, foi detectado nesse subgrupo e reuniu um isolado (2172) do igarapé Igarabar em Barcarena, 5 isolados do igarapé Paracuri de Belém, dentre estes, 3 isolados (2223, 2233 e 2235) provenientes do Paracuri1 e 2 isolados (2713 e 2724) do Paracuri106, além de 2 isolados (601 e 602) da baía do Guajará. Outro clone incluiu 1 isolado (2154) de água de poço de uma escola no município de Mojú e 1 isolado (2718) do igarapé Paracuri (Paracuri106) de Belém. Um terceiro clone, neste mesmo subgrupo, envolveu 1 isolado (1395) de alimento (carne bovina) oriundo de Ananindeua e um isolado (637) de água de esgoto de Belém.

O grupo B se dividiu em dois subgrupos: subgrupo B1, que abrangeu o maior número de isolados de *Salmonella* Panama entre os 4 subgrupos, 52 isolados no total, foi determinado com 84,63% de similaridade genética, este subgrupo se subdividiu em vários níveis de similaridade. Enquanto o subgrupo B2 foi definido com 92,86% de similaridade entre os isolados. Foram encontrados 36 perfis genotípicos diferentes no subgrupo B1, que, por sua vez, possibilitou a identificação de 9 clones.

Entre os isolados de *Salmonella* Panama provenientes de águas superficiais da Floresta Nacional de Caxiuanã em Melgaço, foram detectados 5 clones

presentes no subgrupo B1, o maior clone desse subgrupo reuniu 5 isolados, 1 isolado (2072) do igarapé Açacu, 1 isolado (2454) do igarapé Curuá, 2 isolados (2333 e 2335) do igarapé Arauá e 1 isolado (2435) do igarapé Curuazinho. Outro clone agrupou 1 isolado (2430) do igarapé Campinho e 1 isolado (2436) do igarapé Curuazinho. Ainda em Melgaço, 3 clones foram detectados no subgrupo B1, um clone foi representado por 3 isolados (1977, 1983 e 1984) do igarapé Grande e 2 clones do igarapé Aricurú representados por 3 isolados (2295, 2299 e 2298) do ano de 2001 e 4 isolados (1949, 1957, 1961 e 1966) do ano de 1998.

Em diferentes ambientes aquáticos no município de Belém foi observada a ocorrência de clones entre isolados de *Salmonella* Panama, os que se reuniram no subgrupo B1, totalizaram 4 clones. Um clone com 2 isolados (611 e 615) do rio Guamá, um clone com 2 isolados (625 e 629) do igarapé Tucunduba, um clone com 2 isolados (2278 e 2280) do igarapé Combu (Combu21) e um clone com 2 isolados (821 e 823) da baía do Guajará.

No menor subgrupo em número de isolados, o subgrupo B2, foram identificados apenas 2 perfis genotípicos, um deles equivalente à um clone representado por 5 isolados de animal silvestre de *Salmonella* Panama (1433, 1434, 1435, 1436 e 1437) oriundos de um mesmo reservatório animal (um roedor), o outro perfil representado por 1 isolado (2150) de água de poço de uma escola de Mojú.

No subgrupo A1, observa-se que 2 isolados (2160 e 2158) de *Salmonella* Panama do igarapé Levy em Mojú, obtidos a partir da mesma amostra de água coletada em agosto de 1999 apresentaram perfis genotípicos distintos e que 2 isolados (647 e 590) do igarapé Tucunduba em Belém, obtidos a partir de amostras de água coletadas

no mesmo ano (1996), porém em meses diferentes (junho e abril, respectivamente), apresentaram perfis genotípicos diferentes.

Os isolados de *Salmonella* Panama do igarapé Paracuri em Belém, no subgrupo A2, demonstram que entre 4 isolados do Paracuri1, obtidos em isolamento primário da mesma amostra de água coletada em setembro de 2000, distingue-se um clone (isolados 2223, 2233 e 2235) anteriormente descrito e 1 isolado (2222) com perfil genotípico distinto, além disso, dos 4 isolados de *Salmonella* Panama provenientes da mesma amostra de água (Paracuri106) em abril de 2001 e, portanto, obtidas de colônias diferentes na mesma placa de isolamento primário, 2 isolados (2713 e 2724) pertenciam à 1 clone já descrito e 2 isolados (2718 e 2723) possuíam perfis genotípicos diferentes entre si. No subgrupo B1, outros 3 isolados (2242, 2246 e 2245) advindos da mesma amostra de água do Paracuri3 coletada em setembro de 2000 apresentaram perfis genotípicos diferentes.

Em Belém, 2 isolados de *Salmonella* Panama, oriundos da mesma amostra de água de esgoto do Una obtida em junho de 1996, foram detectados em subgrupos diferentes, 1 isolado (637) no subgrupo A2 e 1 isolado (639) no subgrupo B1, neste último subgrupo também foi identificado 1 isolado (816) de água de esgoto do Una obtido em outubro de 1996. O isolado (400) de esgoto do Aeroporto de Belém foi detectado no subgrupo A2.

O dendograma (Figura 2) revela que 2 isolados *Salmonella* Panama do rio Mucurycá em Barcarena provenientes da mesma amostra de água coletada em dezembro de 1999 foram detectados em subgrupos diferentes, 1 isolado (2181) no subgrupo A2 e 1 isolado (2179) no subgrupo B1.

Em Melgaço, os isolados ambientais de *Salmonella* Panama obtidos em isolamento primário na mesma placa da mesma amostra de água coletada em diferentes igarapés da Floresta Nacional de Caxiuanã demonstraram diversidade genotípica. Dois isolados (2072 e 2073) do igarapé Açacu tiveram perfis genotípicos distintos, sendo que 1 isolado (2072) fez parte de um clone, entre 4 isolados do igarapé Curuá, 1 isolado (2454) fez parte de um clone e 3 isolados (2456, 2458 e 2459) tiveram perfis genotípicos diferentes, 2 isolados (2333 e 2335) do igarapé Arauá fizeram parte de um clone e 1 isolado (2332) dessa mesma fonte apresentou um perfil genotípico diferente. Dois isolados (2435 e 2436) da mesma amostra de água do igarapé Curuazinho se agruparam em clones diferentes. Dentre 4 isolados de *Salmonella* Panama do igarapé Aricurú obtidos em junho de 2001, 3 isolados se reuniram em um clone anteriormente citado e 1 isolado (2300) obteve um perfil diferente. Entre 5 isolados do igarapé Aricurú obtidos em julho de 1998, 4 isolados representaram um clone já descrito e 1 isolado (1965) apresentou perfil genotípico diferente. Todos os isolados de *Salmonella* Panama do igarapé Retiro, incluindo 1 isolado (2003) de julho de 1998 e 4 isolados (2315, 2322, 2312 e 2318) obtidos em junho de 2001, apresentaram perfis genotípicos diferentes. Entre 4 isolados do igarapé Grande obtidos em julho de 1998, 3 isolados representaram um clone já descrito e 1 isolado (1974) obteve perfil diferente, além disso 1 isolado (2311) de junho de 2001 dessa mesma fonte também apresentou perfil diferente.

Os isolados de *Salmonella* Panama de origem humana, 3 isolados (1202, 7245 e 852) oriundos de Juruti e 1 (7337) de Belém, 1 isolado (1656) de alimento (carne bovina) e 1 isolado ambiental (161) do esgoto do Terminal Rodoviário de Belém se reuniram no subgrupo B1.

Entre 2 isolados de *Salmonella* Panama provenientes da mesma amostra de água do igarapé Igarabar em Barcarena, um deles (2172) fez parte de um clone no subgrupo A2, o outro isolado (2169) apresentou um perfil diferente no subgrupo B1. De modo similar, entre 2 isolados de água de poço de uma escola em Mojú, um isolado fez parte de um clone no subgrupo A2 e o outro isolado (2150) obteve um perfil genotípico diferente no subgrupo B2.

4 DISCUSSÃO

A gastroenterite por *Salmonella* é uma doença infecciosa aguda de distribuição mundial. Vários sorovares de *Salmonella* estão implicados em surtos e casos esporádicos de gastroenterite no homem, incluindo crianças e adultos. É também relevante a suscetibilidade de hospedeiros imunodeprimidos por diferentes condições de saúde (Morris & Potter, 1997; Trabulsi *et al.*, 2002; Nascimento, 2007; Uppal *et al.*, 2009; Mussime *et al.*, 2010).

A salmonelose é uma zoonose e por isso conta com uma ampla diversidade de reservatórios animais, tanto em ambiente doméstico como em ambientes naturais, com destaque para fazendas de criação de animais destinados ao abate, especialmente bovinos e suínos e granjas de criação de aves (Humphrey, 2000; Borsoi, 2005; Menin *et al.*, 2008). Muitos sorovares de *Salmonella* são ubiqüitários e podem causar infecção intestinal em diferentes espécies animais, inclusive no homem, havendo, portanto, uma relação com a cadeia de transmissão da salmonelose que envolve o consumo humano de carne de animais contaminados. A contaminação de carnes, por exemplo, de aves ou mamíferos, aponta para o manejo inadequado no abate e evisceração dos animais. Acrescenta-se que o isolamento de salmonela a partir de fezes de animais demonstra que este microrganismo tanto pode compor a microbiota intestinal, como pode ser o agente do processo infeccioso (Humphrey, 2000).

A vasta fauna silvestre brasileira, principalmente a avifauna, também se constitui como uma fonte de salmonelose para o homem, fornecendo reservatórios e propiciando a disseminação de sorovares de *Salmonella* antes não implicados com infecção humana (Hofer *et al.*, 1997; Marine & Garcia, 2005; Lopes, 2008).

Não obstante, os excretos animais e do homem infectados são frequentemente eliminados no ambiente, servindo de fonte contaminação de ambientes aquáticos. Embora a dose infectante para se estabelecer infecção no homem varie entre os sorotipos e seja relativamente mais elevada do que em outras enterobacteriáceas (Varnam & Evans, 1991), a presença de salmonela na água compromete sua qualidade microbiológica, principalmente em localidades que não possuem rede e sistema de tratamento de água e esgoto, constituindo-se como grande problema de saúde pública. A ausência de saneamento básico afeta comunidades pobres que geralmente são alvo de doenças infecciosas veiculadas pela água como a febre tifóide, causada pela *Salmonella Typhi*, cujo único reservatório animal é o homem (Rodrigues & Malafaia, 2009).

Existe uma crescente preocupação no âmbito do controle de doenças infecciosas causada por enteropatógenos bacterianos emergentes, por conta da multirresistência a antibióticos, especialmente em países subdesenvolvidos. Ressalta-se que nestes países a salmonelose é transmitida não somente por alimentos, que é o principal veículo de transmissão nos países desenvolvidos, mas também, pela ingestão de água contaminada (Rodrigues & Malafaia, 2009; Kariuki, 2010).

A resistência da salmonela aos antibióticos pode ser explicada, pelo menos em parte, pelo uso indiscriminado de antibióticos (Gurgel & Carvalho, 2008) e pela seleção de cepas resistentes em ambiente hospitalar (Esper *et al.*, 1998; Jure *et al.*, 2010); além disso, menciona-se o uso de antibióticos em ração animal (Andreotti & Nicodemo, 2004). Em ambientes naturais há uma seleção de cepas de *Salmonella* resistentes à drogas. Essa pressão seletiva é exercida por organismos, como fungos, que naturalmente sintetizam antimicrobianos (Takahashi & Lucas, 2008).

Salmonella Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis exercem posição de destaque na gastroenterite aguda, sendo relatados surtos, com elevada frequência, associados à ingestão de alimento de origem animal. Esta ocorrência é observada não somente no Brasil, mas também, em outros países (Pizzolitto *et al.*, 2007; Bruun *et al.*, 2009; Much *et al.*, 2009; Kottwitz *et al.*, 2010).

A emergência de isolados representados por clones multidrogaresistentes (MDR) não somente dos sorovares *S.*Typhimurium, *S.*Enteritidis e *S.*Typhi, mas também de sorovares isolados com menos frequência é uma realidade em diferentes países do mundo (Keddy *et al.*, 2010; Lucarelli *et al.*, 2010; Sirichote *et al.*, 2010; Vaz *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). Alguns sorovares, como *S.*Panama, *S.*Dublin e *S.*Choleraesuis, além de serem agentes de gastroenterite aguda podem causar bacteremia, neste último caso, atingindo principalmente crianças e pacientes debilitados (Wilkins & Roberts, 1988; Chiu *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2002; Choudhury *et al.*, 2006). Neste sentido, a existência de genótipos de *S.* Panama multirresistentes aos antibióticos é uma ameaça à comunidade e em ambientes hospitalares (Tsai *et al.*, 2007).

A circulação de clones MDR é observada em diferentes cidades, países e continentes, indicando que isolados de *Salmonella* com mesmo perfil genotípico e fenotípico estão sendo disseminados pelo homem. Existe grande diversidade genética entre os sorovares *S.*Typhimurium, *S.*Enteritidis e *S.*Typhi; da mesma forma que é detectada a ocorrência de clones prevalentes (Harnett *et al.*, 1998; Adesiyun *et al.*, 2000; Weill *et al.*, 2006). Os perfis ou modelos de resistência são variáveis, e cada vez mais cresce a resistência a diferentes classes de antibióticos, se propagando entre os países por meio de viagens para o exterior, principalmente de pessoas dos países

desenvolvidos em visita a países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (Kubota *et al.*, 2005).

A partir da avaliação do dendograma (Figura 2) observa-se um clone no subgrupo A2, representado por 1 isolado de *S. Panama* de alimento (carne bovina) de Ananindeua (1395) e um isolado de água de esgoto do Una em Belém (637).

Na Estação de Tratamento de Esgoto do Una em Belém são recebidos dejetos tanto de atividades domésticas, quanto fezes de origem humana e animal, logo, o isolado proveniente deste ponto pode ter como origem qualquer uma dessas fontes de contaminação, além disso, infere-se que há uma circulação de clones de *S. Panama* entre cidades vizinhas (Belém e Ananindeua). Existe evidência da circulação de clones tipados por PFGE entre isolados de *Salmonella* spp. de origem humana e de esgoto, sendo que os clones de origem humana foram identificados antes de sua detecção em efluentes de esgoto, sugerindo que as fezes humanas seriam a fonte de contaminação (Sahlström *et al.*, 2006). Há semelhança entre os perfis genotípicos de salmonela responsáveis pela infecção intestinal no gado bovino e aqueles que são identificados como causa de gastroenterite no homem (Ghebreyes *et al.*, 2009). No México, clones PFGE com mesmo padrão de resistência foram detectados tanto em isolados de *S. Typhimurium* de crianças hospitalizadas quanto em isolados de alimentos (galinha, porco e boi) (Zaidi *et al.*, 2007).

No subgrupo A1, um clone de *S. Panama* com 2 isolados de água de poço de Anajás (2185 e 2190), um isolado humano de Belém (4933) e um isolado do igarapé Tucunduba em Belém (647) revela uma identidade genotípica entre o isolado de *S. Panama* detectado nas fezes humanas, em relação aos isolados detectados no igarapé Tucunduba e no poço em Anajás, provendo evidência epidemiológica de que pode ter

ocorrido uma contaminação de água superficial e subterrânea com excretos de origem humana, ou seja, os clones detectados no ambiente teriam sido eliminados nas fezes humanas. Ressalta-se que, em Belém, o igarapé Tucunduba recebe descarga de esgoto e que a fonte em Anajás onde foi detectado este clone, não possui saneamento básico (Loureiro, 2007). Clones de isolados de *Salmonella* foram identificados no sul da África em amostras de rio e água de esgoto, evidenciando a contaminação de água superficial por água de esgoto (Mafu *et al.*, 2009). Martinez-Urtaza *et al.* (2006) identificaram clones de *Salmonella* Paratyphi B em isolados humanos e isolados de moluscos de água de mar na Espanha, neste caso, o consumo de molusco contaminado provavelmente pela água do mar com resíduos fecais de origem humana, contribuiu para manutenção da salmonelose entre os anos 1999 e 2004.

Também no subgrupo A1, um clone com 3 isolados de *S. Panama* do igarapé Combu (2739, 2740 e 2741), este localizado na ilha do Combu, por sua vez, posicionada frente à orla fluvial de Belém e um clone com 2 isolados de água de poço de Barcarena (2174 e 2176), demonstraram que apesar da evidente contaminação desses ambientes estes clones foram identificados unicamente nestas fontes, embora haja uma proximidade geográfica entre a ilha do Combu e a orla de Belém, e os isolados de poço em Barcarena terem sido obtidos na mesma data, novembro de 1999, que os isolados do igarapé Igarabar também em Barcarena (2172 e 2169).

No subgrupo A2, o maior clone e mais prevalente com 8 isolados de *S. Panama*, 1 do igarapé Igarabar em Barcarena (2172), 5 do igarapé Paracuri em Belém (2223, 2233, 2235, 2713 e 2724) e 2 da baía do Guajará em Belém (601 e 602), indica que este clone esteve presente em águas superficiais de dois municípios diferentes, Belém e Barcarena, bem como em ambientes aquáticos diferentes, igarapé e baía, da

mesma localidade, município de Belém, além disso em anos diferentes neste mesmo município 1996, 2000 e 2001. Isso demonstra que este clone de *S. Panama* não foi mais observado no ambiente, em Belém, por 3 anos, e que esteve circulando em água de igarapé de localidades diferentes: Barcarena e Belém.

Esta persistência no ambiente pode estar relacionada com a contínua eliminação do agente pelos excretos humanos que podem contaminar a água de consumo e alimentos. Este clone foi primeiramente detectado na baía do Guajará em 1996, seguido do igarapé Igarabar em 1999 e do igarapé Paracuri em 2000 e 2001. Destaca-se que o igarapé Paracuri e a baía do Guajará, em Belém, recebem descarga de esgoto, sendo que a baía do Guajará contorna a orla desse município (Loureiro, 2007). Além disso, há populações ribeirinhas situadas às margens tanto do igarapé Paracuri quanto do igarapé Combu, citado anteriormente (Ribeiro, 2004).

Os clones mais prevalentes de *S. Senftenberg*, um deles composto por isolados de água do mar e moluscos persistiu no ambiente por 5 anos e outro clone representado por isolados de água de esgoto e moluscos persistiu no ambiente por 3 anos, relatando a constante circulação de clones em áreas costeiras de produção de moluscos na Espanha, decorrente da contaminação ambiental (Martinez-Urtaza & Liebana, 2005).

Outro clone, no subgrupo A2, apresenta um isolado de água de poço de uma escola de Mojú (2154) e um isolado do igarapé Paracuri de Belém (2718), como mencionado o Paracuri recebe descarga de esgoto, que se constitui tanto de resíduos de origem humana quanto animal, logo este clone pode ter relação com a contaminação ambiental por *S. Panama* presente em outros reservatórios de origem animal, além do próprio homem. Acrescenta-se que a falta de saneamento básico que implica na

ausência de rede de esgoto e de distribuição de água tratada é um fato em comunidades carentes, o que leva a utilização de água de poço e água superficial muitas vezes sujeita à contaminação, principalmente por ação humana (Feachem, 1983).

Dentre 5 clones de *S. Panama* do grupo A presentes em ambientes aquáticos no município de Belém, 4 clones foram individualmente detectados nos municípios de Anajás (água de poço), Barcarena (igarapé), Moju (água de poço) e Ananindeua (carne bovina), o que sugere possível disseminação de clones entre diferentes municípios e posiciona, em alguns casos, o município de Belém, o maior em termo populacional, como ponto de partida, visto que alguns clones foram primeiramente detectados em Belém.

Entre os isolados de *S. Panama* de águas superficiais da Floresta Nacional de Caxiuanã em Melgaço, o maior clone com 5 isolados do subgrupo B1, 1 do igarapé Açacu (2072) , 1 do igarapé Curuá (2454), 2 do igarapé Arauá (2333 e 2335) e 1 do igarapé Curuazinho (2435) torna evidente que há uma circulação desse clone em diferentes pontos da Floresta Nacional de Caxiuanã, e que este clone está presente no ambiente entre 1998, detectado no igarapé Açacu, e o ano de 2001, detectado nos igarapés Curuá, Arauá e Curuazinho. Existiu uma prevalência desse clone no ambiente favorecida possivelmente pelo processo de adaptação, enfatiza-se que para este clone ser detectado na água em 1998 e 2001, houve necessidade de um reservatório, provavelmente representado pela fauna silvestre da Floresta Nacional de Caxiuanã. Outro clone agrupou 1 isolado do igarapé Campinho (2430) e 1 isolado do igarapé Curuazinho (2436), que reafirma a presença de clones circulando em diferentes igarapés, estes cursos de água correspondem a ramificações do rio Caxiuanã localizado no interior da Floresta Nacional de Caxiuanã (Loureiro, 2007).

A partir do dendograma (Figura 2), observa-se que tanto clones detectados apenas em Melgaço, dentre eles: um clone com 3 isolados do igarapé Grande (1977, 1983 e 1984) e 2 clones do igarapé Aricurú com 3 isolados do ano de 2001 (2295, 2299 e 2298) e 4 isolados do ano de 1998 (1949, 1957, 1961 e 1966), quanto clones detectados apenas em Belém: um clone com 2 isolados do rio Guamá (611 e 615), um clone com 2 isolados do igarapé Tucunduba (625 e 629), um clone com 2 isolados do igarapé Combu (2278 e 2280) e um clone com 2 isolados da baía do Guajará (821 e 823) se reuniram no subgrupo B1 com 84,63% de similaridade genética. Isto implica dizer que a diversidade genotípica que hoje se observa em áreas urbanas pode ter sido proveniente de ambientes naturais, essa disseminação de genótipos pode ter sido facilitada por migração de animais silvestres ou pela ação humana em ambientes naturais (Marine & Garcia, 2005; Lopes, 2008).

No subgrupo B2, foi identificado um clone com 5 isolados de animal silvestre de *S. Panama* do mesmo reservatório animal (1433, 1434, 1435, 1436 e 1437), esse clone não foi identificado em nenhuma fonte ambiental da Floresta Nacional de Caxiuanã, nem em nenhum dos isolados de alimentos (carne bovina), entretanto estiveram mais proximamente relacionados com os isolados do subgrupo B1 em um nível de 83,87 % de similaridade, subgrupo onde se reuniu todos os isolados de igarapé da Floresta Nacional de Caxiuanã. O fato desse clone de *S. Panama* ter sido obtido a partir de um roedor, que interage com o ambiente por diversos hábitos e que pode albergar uma gama de microrganismos (Murray, 2000), sugere que este animal estava infectado por *S. Panama* pertencente unicamente a este genótipo.

A partir do dendograma (Figura 2) observa-se que o clone de animal silvestre de *S. Panama* se agrupou no subgrupo B2 com 92,86 % de similaridade em

relação a um isolado de água de poço de uma escola de Mojú, essa água subterrânea pode ter sido contaminada por fezes de origem humana ou animal, ou então por ambas. Clones de *Salmonella* Cerro e *Salmonella* Newport foram identificados entre isolados de leões marinhos e porco selvagem em ilhas na Nova Zelândia, que implica na circulação de clones de *Salmonella* entre mamíferos silvestres (Fenwick *et al.*, 2004). Nos EUA, um clone de *S. Typhimurium* responsável por um surto esteve proximamente relacionado a um clone identificado entre roedores de estimação, sinalizando que esses animais seriam possíveis reservatórios da salmonelose humana em ambiente doméstico (Swanson *et al.*, 2007). Foi observada a presença de clones de *S. Typhimurium* em isolados de aves selvagens e animais domésticos (boi, porco, cavalo, gato, peru, pombos, entre outros), revelando a transmissão da salmonelose de animais silvestres para animais domesticados pelo homem (Refsum *et al.*, 2002).

Os clones encontrados na Floresta Nacional de Caxiuanã (Melgaço) não foram observados nos municípios de Belém e Barcarena, e vice-versa. De forma que os clones de *S. Panama* encontrados parecem estar bem adaptados ao ambiente e aos reservatórios silvestres, e todos foram detectados no subgrupo B1, por outro lado alguns clones de *S. Panama* detectados em áreas urbanas como Belém e Barcarena indicaram uma ligação epidemiológica entre a infecção humana e a contaminação ambiental. A sobrevivência da salmonela em ambientes diferentes pode ser explicada por sua capacidade de adaptação em tais ambientes, inclusive em termos de variação de pH, temperatura e salinidade (Foltz, 1969; Varnam & Evans, 1991; Winfield & Groisman, 2003). Segundo Refsum *et al.* (2002) e Adaska *et al.* (2008) a diversidade genotípica reflete, em parte, a predileção ou maior adaptação de isolados de *Salmonella* a reservatórios animais diferentes, pelo menos para o sorovar Typhimurium.

Elevada diversidade genotípica foi detectada entre 89 isolados de *S. Panama* por meio da tipagem por PFGE, e 54 perfis de restrição distintos. A diversidade genética foi nítida entre os isolados de origem ambiental, sendo inclusive detectada entre isolados obtidos a partir da mesma placa de isolamento primário em diferentes fontes e municípios, dentre eles, no igarapé Levy e na água de poço de uma escola em Mojú, no igarapé Paracuri em Belém (Paracuri1, Paracuri3 e Paracuri106), no esgoto do Una em Belém, no rio Mucurycá e no igarapé Igarabar em Barcarena, e nos igarapés: Açacu, Curuá, Arauá, Curuazinho, Aricurú, Retiro e Grande, localizados na Floresta Nacional de Caxiuanã em Melgaço, confirmando a assertiva de que nem sempre todas as colônias de uma placa de isolamento primário com o mesmo aspecto ou morfologia colonial, provenientes da mesma amostra de origem ambiental, correspondem a um clone. Grande diversidade genotípica foi encontrada em águas superficiais da Floresta Nacional de Caxiuanã, indicando que diversas espécies animais possivelmente de aves, répteis e mamíferos contribuem para tal diversidade e atuam indubitavelmente como reservatórios.

Apesar disso os modelos de resistência obtidos em todos os 110 isolados de *S. Panama* (Tabela1) foram bastante semelhantes entre si, quando seria esperado que os isolados obtidos em Belém e Barcarena, e até mesmo em Anajás e Mojú, apresentassem uma resistência maior a antibióticos, devido a uma maior pressão seletiva por meio do uso de antibióticos pela população, administração de antibióticos em animais destinados ao consumo humano e emergência de cepas resistentes em ambiente hospitalar (Esper *et al.*, 1998; Andreotti & Nicodemo, 2004; Gurgel & Carvalho, 2008; Jure *et al.*, 2010), e que a resistência a antimicrobianos fosse menor em isolados ambientais da Floresta Nacional de Caxiuanã, que possivelmente são

selecionados por antimicrobianos liberados por fungos ou bactérias em ambientes naturais (Takahashi & Lucas, 2008; Guimarães *et al.*, 2010). Isso demonstra que, de modo geral, todos os isolados de *S. Panama* avaliados possuem uma resistência intrínseca às cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e aos aminoglicosídeos testados; e que provavelmente a pressão seletiva excedente de áreas com ação antrópica ainda não resultou em aumento de resistência a outras classes de antibióticos nos casos dos isolados de Belém, Barcarena, Mojú e Anajás.

O dendograma, visualizado na Figura 2, associado aos modelos de resistência demonstraram a existência de clones MDR de *S. Panama* circulando em diferentes municípios do Estado do Pará, assim como em diferentes fontes. A detecção de clones PFGE de *Salmonella* Schwarzengrund multidrogaresistentes em isolados de alimentos avícolas e isolados humanos na Tailândia, e em alimentos importados deste país e isolados humanos na Dinamarca e Estados Unidos revela a transmissão da salmonelose do animal para o homem e a disseminação de clones MDR para diferentes localidades por meio da importação de alimentos contaminados (Aarestrup *et al.*, 2007).

A avaliação de isolados de *S. Typhimurium* de alimentos (bovinos) e de humanos demonstra um aumento na frequência de resistência a cefalosporinas de amplo espectro no decorrer dos anos (1999 - 2006), indicando que o uso de cefalosporinas na alimentação do gado exerce uma pressão seletiva que favorece isolados cefalosporinas resistentes (Adhikari *et al.*, 2010). No presente estudo, entre as 110 amostras de *S. Panama* avaliadas pelo teste de sensibilidade a antimicrobianos, 100% foram multirresistentes a cefalosporinas de 1ª geração (cefalotina e cefazolina) e 2ª geração (cefuroxima) (Tabela 2 e 4), não foi detectada resistência a cefalosporinas de amplo espectro, entretanto 31 amostras ambientais de *S. Panama* foram intermediários à

cefotaxima (cefalosporina de 3^a geração), dessa maneira se pressupõe uma possível emergência de isolados ambientais produtores de betalactamases de espectro ampliado (ESBL).

Os isolados de *S. Panama* de origem humana (16 isolados), de alimentos (5 isolados) e de animal silvestre (5 isolados) obtidos no Estado do Pará, Brasil, foram 100% multirresistentes à cefalotina, cefazolina, cefuroxima, cefoxitina, gentamicina e tobramicina. Apenas 4 dos 5 isolados de *S. Panama* de animal silvestre demonstraram resistência à estreptomicina (Tabela 2). Enquanto apenas 3 isolados de *S. Panama* de fezes humanas de 139 isolados clínicos e 2 de 121 isolados de alimentos foram resistentes à gentamicina no Chile (Cordano & Vigilio, 1996). Nos EUA, a resistência à cefoxitina e cefalotina foi identificada em 10 isolados humanos (50%) e 16 isolados de gado bovino (80%) de *Salmonella* Newport, além de 4 isolados de gado bovino (20%) resistentes à gentamicina desse mesmo sorovar (Harbottle *et al.*, 2006). Nesse mesmo país, entre 172 isolados de *Salmonella* spp. de carne bovina, 9 isolados foram resistentes à cefoxitina e 1 à gentamicina (Bosivelac *et al.*, 2009).

Na China, de um total de 834 isolados humanos de *Salmonella* spp., 54 (6,2%) foram resistentes à gentamicina (Jin & Ling, 2009). A resistência à gentamicina também foi observada em 12 isolados (60%) de *S. Typhimurium* de 20 isolados humanos do Quênia (Onyango *et al.*, 2009). Entre 33 isolados de *S. Typhimurium* de origem animal, 4 (12%) apresentaram resistência à gentamicina, 15 (45%) à estreptomicina e 7 (21%) à cefalotina, além disso dentre 14 isolados humanos do mesmo sorovar, 1 isolado (7%) foi resistente à gentamicina e 6 isolados (43%), à cefalotina (Benacer *et al.*, 2010). Logo se observa que a resistência à cefalosporinas de 1^a e 2^a geração e aminoglicosídeos é freqüente entre isolados de origem humana e

animal em diferentes países, contudo a frequência de resistência a esses antibióticos encontrada no presente estudo ainda foi mais elevada.

Observou-se que o teste de sensibilidade a antimicrobianos aplicado a 110 amostras de *Salmonella* Panama, resultou em 65 amostras ambientais, 13 amostras humanas, 4 amostras de alimentos e 1 amostra de animal silvestre intermediários à estreptomicina, apenas 10 amostras ambientais (11,9%) e 4 de animal silvestre foram resistentes à estreptomicina. Enquanto em 20 e 19 isolados de origem animal, gado bovino e galinha, respectivamente, foi observada resistência à estreptomicina em 90% e 21% dos isolados (Foley *et al.*, 2006).

Entre 40 cepas ambientais de *Salmonella* de água de rio e de esgoto do sul da África foram encontrados resultados intermediários à aminoglicosídeos (10 amostras resistentes à neomicina e 5 à canamicina) e à estreptomicina (15 amostras) (Mafu *et al.*, 2009). Entre cepas de *Salmonella* sp. em um rio impactado por esgoto no Estado da Paraíba não foi detectada resistência à cefalotina, cefazolina e gentamicina (Fluczynic *et al.*, 2010). Enquanto no presente estudo, 100% das amostras ambientais (84 amostras) de *S. Panama* de rio, igarapé, baía, praia e esgoto foram resistentes à tobramicina e gentamicina (ambos aminoglicosídeos) e cefalosporinas (cefalotina cefazolina e cefuroxima), a resistência à estreptomicina em amostras ambientais de *S. Panama* foi detectada em somente 2 amostras (2,9%) de igarapé em Melgaço, em 4 amostras (5,8%) de igarapé em Belém, 1 amostra (1,4%) de baía em Belém, 1 amostra (1,4%) de praia em Belém, 1 amostra (1,4%) de rio em Barcarena e 1 amostra (11,1%) de esgoto em Belém (tabela 3). Portanto a resistência à estreptomicina das amostras ambientais avaliadas pode ser considerada reduzida, especialmente entre as amostras de Melgaço, em que o ambiente da Floresta Nacional de Caxiuanã seria propício para

seleção de amostras resistentes à estreptomicina por meio da pressão seletiva exercida por microrganismos que naturalmente produzem esse antibiótico (Guimarães *et al.*, 2010).

É importante observar que muitas amostras de *S. Panama* com diferentes perfis genotípicos, inclusive algumas amostras que representaram clones, também apresentaram diferentes modelos de resistência, logo se infere não existir relação aparente entre os perfis genotípicos resultantes da genotipagem por PFGE e os perfis fenotípicos obtidos a partir do teste de sensibilidade a antimicrobianos.

5 CONCLUSÕES

- As 110 amostras de *S. Panama* apresentaram resistência múltipla às cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e aos aminoglicosídeos testados, entretanto, deve-se destacar a baixa resistência à estreptomicina e a possível emergência de amostras ambientais produtoras de ESBL;
- A tipagem genotípica por PFGE das amostras de *S. Panama* discriminou 54 perfis de restrição, portanto, detectando considerável diversidade genética;
- Os clones de *S. Panama* encontrados em ambientes aquáticos da Floresta Nacional de Caxiuanã, sob proteção ambiental, não foram detectados em Belém, município com ação antrópica evidente, sugerindo uma adaptação a ambientes e a reservatórios diferentes;
- A persistência de clones de *S. Panama* em ambientes aquáticos no decorrer dos anos foi observada tanto entre amostras da Floresta Nacional de Caxiuanã quanto entre amostras de Belém;
- A ocorrência de clones de *S. Panama* foi identificada em diferentes municípios do Estado do Pará, evidenciando a circulação de clones entre diferentes localidades;
- Foi observado que muitas amostras de *S. Panama* com diferentes perfis genotípicos, tanto de ambientes aquáticos da Floresta Nacional de Caxiuanã, sob proteção ambiental, quanto de municípios como Belém e Barcarena, com ação antrópica evidente, também apresentaram diferentes modelos de resistência, indicando não existir relação entre os perfis genotípicos resultantes da genotipagem por PFGE e os perfis fenotípicos obtidos a partir do teste de sensibilidade a antimicrobianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M., HENDRIKSEN, R.S., LOCKETT, J., GAY, K., TEATES, K., McDERMOTT, P.F., WHITE, D.G., HASMAN, H., SØRENSEN, G., BANGTRAKULNONTH, A., PORNREONGWONG, S., PULSRIKARN, C., ANGULO, F.J., GENER-SMIDT, P. International spread of multidrug-resistant *Salmonella* Schwarzengrund in food products. **Emerging Infectious Diseases**, **13**: 726-731, 2007.
- ADASKA, J.M., SILVA, A.J., SISCHO, W.M. Comparison of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium isolates from dairy cattle and humans using *in vitro* assays of virulence. **Veterinary Microbiology**, **128**: 90-95, 2008.
- ADESYSIUN, A., CARSON, A., McADOO, K., BAILEY, C. Molecular analysis of *Salmonella* Enteritidis isolates from the Caribbean by pulsed field gel electrophoresis. **Pan American Journal of Public Health**, **8**: 342-347, 2000.
- ADHIKARI, B., BESSER, T.E., GAY, J.M., FOX, L.K., HANCOCK, D.D., DAVIS, M. A. Multilocus variable-number tandem-repeat analysis and plasmid profiling to study the occurrence of *bla*_{CMY-2} within a pulsed-field gel electrophoresis-defined clade of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Applied and Environmental Microbiology**, **76**: 69-74, 2010.
- ANDREOTTI, R. & NICODEMO, M.L.F. **Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência**. Campo Grande, Brasil. Embrapa Gado de Corte, 2004. 50p.
- ARORA, A., SINGH, S., AGGARWAL, A., AGGARWAL, P.K. *Salmonella* osteomyelitis in an otherwise healthy adult male - successful mangement with

- conservative treatment: a case report. **Journal of Orthopaedic Surgery**, **11**: 217-220, 2003.
- BADRINATH, P., SUNDKVIST, T., MAHGOUB, H., KENT, R. An outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 34a infection associated with a Chinese restaurant in Suffolk, United Kingdom. **BMC Public Health**, **4**: 40-44, 2004.
- BAUDART, J., GRABULOS, J., BARUSSEAU, J.-P., LEBARON, P. *Salmonella* spp. and fecal coliform loads in coastal waters from a point vs. nonpoint source of pollution. **Journal of Environmental Quality**, **29**: 241-250, 2000.
- BAUDART, J., LEMARCHAND, K., BRISABOIS, A., LEBARON, P. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. **Applied and Environmental Microbiology**, **66**: 1544-1552, 2000.
- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal Clinical Pathology**, **45**: 493-496, 1966.
- BÄUMLER, T. Virulence mechanisms of *Salmonella* and their genetic basis. In: **Salmonella in Domestic animals**. Wray, C. & Wray, A. (eds). CABI Publishing, New York, USA, 2000. 463p. p.57-72.
- BENACER, D., THONG, K.L., WATANABE, H., PUTHUCHEARY, S.D. Characterization of drug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes, and PFGE. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, **20**: 1042-1052, 2010.
- BLASER, M.J., NEWMAN, L.S. A review of human salmonellosis: I. Infective dose. **Review Infection Diseases**, **4**: 1096-1106, 1982.

- BORMAN, E.K., STUART, C.A., WHEELER, K. Taxonomy of the family. **Journal of Bacteriology**, **48**: 351-367, 1944.
- BORSOI, A. **Ocorrência, contagem e resistência antimicrobiana de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas e pesquisa de *Salmonella* em galpões de frango de corte.** Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)- Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005, 78p.
- BOSIVELAC, J.M., GUERINI, M.N., KALCHAYANAND, N., KOOHMARAIE, M. Prevalence and characterization of Salmonellae in commercial ground beef in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, **75**: 1892-1900, 2009.
- BRADEN, C.R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in United States. **Clinical Infectious Diseases**, **43**: 512-517, 2006.
- BRUNN, T., SØRENSEN, G., FORSHELL, L.P., JENSEN, T., NYGARD, K., KAPPERUD, G., LINDSTEDT, B.A., BERGLUND, T., WINGSTRAND, A., PETERSEN, R.F., MÜLLER, L., KJELSØ, C., IVARSSON, S., HJERTQVIST, M., LÖFDAHLS, S., ETHELBERG, S. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium infections in Denmark, Norway and Sweden, 2008. **Eurosurveillance**, **14**: 1-6, 2009.
- BUSETTI, M., LONGO, B., COLONNA, F., DIBELLO, D., BARBI, E., CAMPELLO, C. Case report: *Salmonella* Panama osteomyelitis in a Ghanaian child with sickle cell disease. **La Pediatria Medica e Chirurgia**, **24**: 390-391, 2002.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL. Outbreak of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections associated with consumption of unpasteurized mexican-style aged cheese. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, **57**: 432-435, 2008.

- CHANDEL, D.S., CHAUDRY, R., DEY, A.B., MALHOTRA, P. Molecular typing reveals an unique clone of *Salmonella enterica* serotype Typhi among Indian strains. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 2673-2675, 2006.
- CHEN, T.-L., THIEN, P.-F., LIAW, S.-C., FUNG, C.-P., SIU, L.K. First report of *Salmonella enterica* serotype Panama meningitis associated with consumption of contaminated breast milk by neonate. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 5400-5402, 2005.
- CHIU, C.H., LIN, T.Y., OU, J.T. Predictors for extraintestinal of nontyphoidal *Salmonella* in patients without AIDS. **International Journal of Clinical Practice**, **53**: 161-164, 1999.
- CHOUDHURY, S.A., BERTHAUD, V., WEITKAMP, J.H. Meningitis caused by *Salmonella* Panama in infants. **Journal of Natality Medical Association**, **98**: 219-222, 2006.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement*. CLSI/NCCLS Publication M100-S19, 2009. 83p.
- CORBETT-FEENEY, G. & NI RIAIN, U. The use of pulsed-field gel electrophoresis for subdivision of *Salmonella* Typhimurium in an outbreak situation. **Journal of infection**, **36**: 175-177, 1998.
- CORDANO, A.M. & VIRGILIO, R. Evolution of drug resistance in *Salmonella* Panama isolates in Chile. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **40**: 336-341, 1996.
- COSTALUNGA, S. & TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, **33**: 342-346, 2002.

- EIGUER, T., BUTTA, N., PICANDET, A.M. Serotipos de *Salmonella* en la Republica Argentina aislados de fuentes humanas y no humanas durante el período 1979-1981. **Revista Argentina de Microbiología, 15:** 25-31, 1982.
- ESPER, M.R.N.R., De FREITAS, A.M., FERNADES, S.A., NEME, S.N., TAVECHIO, A.T., CAFÉ, M.L. *Salmonella*: sorotipos identificados das cepas isoladas de pacientes hospitalizados e não hospitalizados, na Região de Presidente Prudente, SP, no período de 1978-1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz, 57:** 45-50, 1998.
- EWING, W.H. Edward and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th. Ed. New York: Elsevier Science Publishing Co., 1986, 362p.
- FAKHR, M.K., NOLAN, L.K., LOGUE, C.M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar typhimurium. **Journal of Clinical Microbiology, 43:** 2215-2219, 2005.
- FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection, 59:** 1091-1101, 1996.
- FARIAS, E.W.C. **Pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* spp. e *Salmonella* spp. em amostras de águas de esgoto e águas de córrego da cidade de São Paulo.** Dissertação (Mestrado em Ciências)- São Paulo, Universidade de São Paulo, 2000, 97p.
- FEACHEM, R.G., BRADLEY, D.J., GARELICK, H., MARA, D.D. **Sanitation and Disease, Health Aspects of Excreta and Wastewater Management.** Washington, USA, John Wiley & Sons, 1983. 501p.

- FENWICK, S.G., DUIGNAN, P.J., NICOL, C.M., LEYLAND, M.J., HUNTER, J.E.B.
A comparison of *Salmonella* serotypes isolated from New Zealand sea lions and feral pigs on the Auckland islands by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Wildlife Diseases**, **40**: 566-570, 2004.
- FERNANDES, S.A., TAVECHIO, A.T., GHILARDI, A.C.R, DIAS, A.M.G., De ALMEIDA, I.A.Z.C., De MELO, L.C.V. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo state, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **48**: 179-184, 2006.
- FERREIRA, E.O. & CAMPOS, L.C. *Salmonella*. In: **Microbiologia**. Trabulsi, L.R. & Alterthum, F. (eds). 5^a ed., São Paulo, Atheneu, 2008. p.329-338.
- FLUCZYNIC, C.E.N., De SOUZA, J.H., PALMEIRA, J.D., FERREIRA, S.B., ANTUNES, R.M.P., De ARRUDA, T.A., MORAIS, M.R., CATÃO, M.R. Perfil de sensibilidade de *Salmonella* sp. de ambiente aquático a antimicrobianos comerciais e a extratos hidroalcoólicos de plantas medicinais. **RBAC**, **42**: 141-141, 2010.
- FOCACCIA, R., MATTEI, S.M.M., De LIMA, V.P., SARAVÍA-GOMES, J. Febres tifóide e paratifóide. In: **Tratado de Infectologia**. Veronesi, R. & Focaccia, R. (eds). São Paulo, Atheneu, 2009. p. 1029-1041.
- FOLEY, S.L., WHITE, D.G., DERMOTT, P.F., WALKER, R.D., RHODES, B., FEDORKA-CRAY, P.J., SIMJEE, S., ZHAO, S. Comparison of subtyping methods for differentiating *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates obtained from food animal sources. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 3569-3577, 2006.
- FOLTZ, V.D. *Salmonella* Ecology. **Journal of American Oil Chemists Societ**: 222-224, 1969. 46p.

- FONSECA, E.L., MYKYTCZUC, O.L., ASENSI, M. D., REIS, E.M.F., FERRAZ, L.R., PAULA, F.L., Ng, L.K., RODRIGUES, D.P. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four Public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 2767-2772, 2006.
- FRANZOLIN, M.R., CAMPOS, L.C., TRABULSI, L.R. Salmoneloses. In: **Tratado de infectologia**. Focaccia, R. (ed). São Paulo, Atheneu, 2005. p. 1081-1085.
- GEBREYES, W.A., THAKUR, S., DORR, P., TADESSE, D.A. Occurrence of *spvA* virulence gene and clinical significance for multidrug-resistant *Salmonella* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, **47**: 777-780, 2009.
- GORMAN, R. & ADLEY, C.C. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food, and animal sources in the Republic of Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, **42**: 2314-2316, 2004.
- GUALLAR, C., ARIZA, J., DOMINGUEZ, M.A., PEÑA, C., GRAU, I., VERDAGUER, R., TORRENS, L., GUDIOL, F. An insidious nosocomial outbreak due to *Salmonella* Enteritidis. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, **25**: 10-15, 2004.
- GUIMARÃES, D.O., MOMESSO, L. Da S., PUPO, M.T. Revisão. Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, **33**: 667-679, 2010.
- GURGEL, T.C. & CARVALHO, W.S. A assistência farmacêutica e o aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, **27**: 118-123, 2008.

- HARBOTTLE, H., WHITE, D.G., McDERMOTT, P.F., WALKER, R.D., ZHAO, S.
Comparison of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial susceptibility typing for characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 2449-2457, 2006.
- HARNETT, N., McLEOD, S., AUYONG, Y., WAN, J., ALEXANDER, S., KHAKHRIA, R., KHRISHNAN, C. Molecular characterization of multiresistant strains of *Salmonella* Typhi from South Asia isolated from Ontario, Canada. **Canadian Journal of Microbiology**, **44**: 356-363, 1998.
- HOFER, E., FILHO, S.J.Da S., Dos REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, **17**: 55-62, 1997.
- HOHMANN, E.L. Nontyphoidal salmonellosis. **Food Safety**, **32**: 263-269, 2001.
- HUMPHREY, T. Public-health aspects of *Salmonella* infection. In: **Salmonella in Domestic animals**. Wray, C. & Wray, A. (eds). CABI Publishing, New York, USA, 2000. 463p. p.245-263.
- HY, T., LIN, J.S., HY, H. Pulsed field gel electrophoresis for animal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, **87**: 73-80, 2002.
- JIN, Y. & LING J.M. Prevalence of integrons in antibiotic-resistant *Salmonella* spp. in Hong Kong. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, **62**: 432-439, 2009.
- JURE, M.A., AULET, O., TREJO, A., CASTILLO, M. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella enterica* serovar Oranienburg (CTX-M-2 group) in

- a pediatric hospital in Tucumán, Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **43**: 121-124, 2010.
- KAIDA, C., KIGAMI, Y., YOSHIOKA, M., SUGIYAMA, Y., YAMANO, C. Food poisoning outbreak caused by *Salmonella* Enteritidis in box lunches distributed by a restaurant. **Japanese Journal of Infectious Disease**, **60**: 71-72, 2007.
- KARIUKI, S. Antimicrobial resistance in enteric pathogens in developing countries. In: **Antimicrobial Resistance in Developing Countries**. A.De J. Sosa, D.K. Byarugaba & C.F. Amábile-Cuevas (eds). Kenya, Kenya Medical Research Institute, 2010. p. 177-197.
- KARIUKI, S., CHEESBROUGH, J., MAURIDIS, A.K., HART, C.A. Typing of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi C isolates from various countries by plasmid profiles and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, **37**: 2058-2060, 1999.
- KEDDY, K.H., SMITH, A.M., SOOKA, A., ISMAIL, H., OLIVER, S. Fluoroquinolone-resistant Typhoid, South Africa. **Emerging Infectious Diseases**, **16**: 879-880, 2010.
- KINDE, H., ADELSON, M., ARDANS, A., LITTLE, E.H., WILLOUGHBY, D., BERCHTOLD, D., READ, D.H., BREITMEYER, R., KERR, D., TARBELL, R., HUGHES, E. Prevalence of *Salmonella* in Municipal sewage treatment plant effluents in Southern California. **Avian Diseases**, **41**: 392-398, 1997.
- KOSTIALA, A.A.I, WESTERSTRAHLE, M., MUTTILAINEN, M. Neonatal *Salmonella* Panama infection with meningitis. **Acta Paediatrica**, **81**: 856-858, 1992.

- KOTTWITZ, L. B. M., De OLIVEIRA, T. C. R. M., ALCOCER, I., FARAH, S. M. De S. S., ABRAHÃO, W. S. M., RODRIGUES, D. Dos P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, **32**: 9-15, 2010.
- KUBOTA, K., BARRETT, T.J., ACKERS, M.L., BRACHMAN, P.S., MINTZ, E.D. Analysis of *Salmonella enterica* serotype Typhi pulsed-field gel electrophoresis patterns associated with international travel. **Journal of Clinical Microbiology**, **43**: 1205-1209, 2005.
- LAPUZ, R., TANI, H., SASAI, K., SHIROTA, K., KATOH, H., BABA, E. An epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis contamination in a rat-infested chicken layer farm, an egg processing facility, and liquid egg samples by pulsed field gel electrophoresis. **Journal of Veterinary Medical Science**, **69**: 649-652, 2007.
- Le MINOR, L. Genus III. *Salmonella* Lignières 1900. In: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds). Williams & Wilkins Co., Baltimore, v.1, 1984. p. 427-458.
- Le MINOR, L. & POPOFF, M.Y. Designation of *Salmonella enterica* sp.nov., nom.rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **37**: 465-468, 1987.
- Le MINOR, L., POPOFF, M.Y., LAURENT, B., HERMANT, D. Individualisation d'une septieme sous-espece of *Salmonella*: *S. choleraesuis* subsp. *indica* subsp. Nov. **Annales de Institute Pasteur**, **137B**: 211-217, 1986.
- Le MINOR, L., VÉRON, M., POPOFF, M. Taxonomie des *Salmonella*. **Annales de Institute Pasteur**, **133B**: 223-243, 1982a.

- LIN, A.W., USERA, M.A., BARRET, T.J., GOLDSBY, R.A. Application of Random Amplified Polymorphic DNA Analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, **34**: 870-876, 1996.
- LOPES, L.F.L. *Salmonella* sp em répteis e aves silvestres no Estado de São Paulo: **Frequência de isolamento, caracterização dos isolados e as conseqüências para o manejo em cativeiro e reintrodução**. Dissertação (Mestrado em Ciências)- São Paulo, Universidade de São Paulo, 2008, 123p.
- LOUREIRO, E.C.B. **Contribuição ao estudo bacteriológico de *Salmonella* oriundas de diferentes fontes da região Amazônica brasileira**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – São Paulo, Universidade de São Paulo, 1990, 102p.
- LOUREIRO, E.C.B. **Epidemiologia Descritiva de *Salmonella* em ecossistemas aquáticos de diferentes áreas do Estado do Pará**. Tese (Doutorado em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários) – Belém, Universidade Federal do Pará, 2007, 163p.
- LUCARELLI, C., DIONISI, A.M., TORPDAHL, M., VILLA, L., GRAZIANI, C., HOPKINS, K., THRELFALL, J., CAPRIOLI, A., LUZZI, I. Evidence for a second genomic island conferring multidrug resistance in a clonal group of strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and its monophasic variant circulating in Italy, Denmark, and the United Kingdom. **Journal of Clinical Microbiology**, **48**: 2103-2109, 2010.
- MAFU, N.C., PIRONCHEVA, G., OKOH, A.I. Genetic diversity and in vitro antibiotic susceptibility profile of *Salmonella* species isolated from domestic water and wastewater sources in the Eastern Cape Province of South Africa. **African Journal of Biotechnology**, **8**: 1263-1269, 2009.

- MARINI, M.A. & GARCIA, F.I. Conservação de aves no Brasil. **Megadiversidade**, **1**: 95-102, 2005.
- MARTINEZ-URTAZA, J., ECHEITA, A., LIEBANA, E. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B isolates from environmental and human sources in Galicia, Spain. **Journal of Food Protection**, **69**: 1280-1285, 2006.
- MARTINEZ-URTAZA, J. & LIEBANA, E. Investigation of clonal distribution and persistence of *Salmonella* Senftenberg in the marine environment and identification of potential sources of contamination. **FEMS Microbiology Ecology**, **52**: 255-263, 2005.
- MARTINEZ-URTAZA, J., LIEBANA, E., GARCIA-MIGURA, L., PEREZ-PIÑEIRO, P., SACO, M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). **Applied and Environmental Microbiology**, **70**: 4030-4034, 2004.
- MARTINEZ-URTAZA, J., SACO, M., De NOVOA, J., PEREZ-PIÑEIRO, P., PEITEADO, J., LOZANO-LEON, A., GARCIA-MARTIN, O. Influence of environmental factors and human activity on the presence of *Salmonella* serovars in a marine environment. **Applied and Environmental Microbiology**, **70**: 2089-2097, 2004.
- MARTINS, M.T., PESSÔA, G.V.A., SANCHEZ, P.S., SATO, M.I., MONTEIRO, C.K., COIMBRÃO, C.A., MARQUES, E. Isolamento de *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. **Revista de Microbiologia**, **19**: 29-39, 1998.

- MARTINS, M.T., SANCHES, P.S., MARQUES, E., MONTEIRO, C.K., MOLINA, A.G. Ten years survey of *Salmonella* and enterovirus in raw and treated waters in the great São Paulo area, Brazil. **Water Science and Technology**, **18**: 53-60, 1986.
- McMAHON, M.A.S., XU, J., MOORE, J.E., BLAIR, I.S., McDOWELL, D.A. Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. **Applied and Environmental Microbiology**, **73**: 211-217, 2007.
- MEDUS, C., SMITH, K.E., BENDER, J.B., BESSER, J.M., HEDBERG, C.W. *Salmonella* outbreaks in restaurants in Minnesota, 1995 through 2003: Evaluation of the role of infected foodworkers. **Journal of Food Protection**, **69**: 1870-1878, 2006.
- MENIN, A., RECK, C., De SOUZA, D., KLEIN, C., VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural, Santa Maria**, **38**: 1687-1693, 2008.
- MERINO, L.A., RONCONI, M.C., NAVIA, M.M., RUIZ, J., SIERRA, J.M., CECH, N.B., LODEIRO, N.S., VILA, J. Analysis of the clonal relationship among clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Infantis by different typing methods. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, **45**: 119-123, 2003.
- MIRZA, S., KARIUKI, S., MAMUN, K.Z., BEECHING, N.J., HART, C.A. Analysis of plasmid and chromosomal DNA of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi from Asia. **Journal of Clinical Microbiology**, **38**: 1449-1452, 2000.
- MISRA, R.N., BAWA, K.S., MAGU, S.K., BHANDARI, S., NAGENDRA, A., MENON, P.K. Outbreak of multi-drug resistant *Salmonella* Typhi enteric fever in Mumbai Garrison. **MJAFI**, **61**: 148-150, 2005.

- MORIÑIGO, M.A., BORREGO, J.J., ROMERO, P. Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. **Journal of Applied Bacteriology**, **61**: 169-176, 1986.
- MORRIS, J.G. & POTTER, M. Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. **Emerging Infectious Diseases**, **3**: 435-441, 1997.
- MUCH, P., PICHLER, J., KASPER, S., LASSING, H., KORNSCHÖBER, C., BUCHNER, A., KÖNIG, C., ALLERBERGER, F.A foodborne outbreak of *Salmonella* Enteritidis phage type 6 in Austria, 2008. **Wiener Klinische Wochenschrift**, **121**: 132-136, 2009.
- MURAKAMI, K., TSHIHARA, T., HORIKAWA, K., ODA, T. Features of *Salmonella* serovars among food handlers in Kyushu, Japan. **New Microbiologia**, **30**: 155-159, 2007.
- MURRAY, C.J. Environmental aspects of *Salmonella*. In: ***Salmonella in Domestic Animals***. Wray, C. & Wray, A. (eds). CABI Publishing, New York, USA, 2000. 463p. p.265-283.
- MUSSIME, V., KALYESUBULA, I., KADDU- MULINDWA, D.,BYARUGABA, J. Enteric bacterial pathogens in HIV-infected children with acute diarrhea in Mulago Referral and Teaching Hospital, Kampala, Uganda. **Journal of International Association of Physicians in AIDS Care**, **8**: 185-190, 2009.
- NASCIMENTO, J. M. C. **Salmoneloses: Avaliação epidemiológica, clínica e laboratorial dos pacientes do Instituto de Infectologia Emílio Ribas com infecção por *Salmonella* spp. do período de janeiro de 1992 a dezembro de 2002**. Dissertação (Mestrado em Ciências)- São Paulo, Universidade de São Paulo, 2007, 73p.

- ONYANGO, M.D., GHEBREMEDHIN, B., WAINDI, E.N., KAKAI, R., RABSCH, W., TIETZE, E., KÖNIG, W., KÖNIG, B. Phenotypic and genotypic analysis of clinical isolates *Salmonella* serovar Typhimurium in western Kenya. **Journal of Infectology for Development of Countries**, **3**: 685-694, 2009.
- OWUSU-OFORI, A. & SCHELD, W.M. Treatment of *Salmonella* meningitis: two case reports and a review of the literature. **International Journal of Infectious Disease**, **7**: 53-60, 2003.
- PERESI, J.T.M., ALMEIDA, I.A.Z.C., LIMA, S.I., MARQUES, D.F., RODRIGUES, E.A.C., FERNANDES, S.A., GELLI, D.F., IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, **32**: 477-478, 1998.
- PIZZOLITTO, N., PIZZOLITTO, E.L., SIMÕES, M.J.S. Espectro de agentes etiológicos associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos em núcleos receptores turísticos de três regiões geográficas do Estado de São Paulo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, **28**: 301-310, 2007.
- PONCE, E., KHAN, A.A., CHENG, C.M., SUMMAGE-WEST, C., CERNIGLIA, C.E. Prevalence and characterization of *Salmonella enterica* serovar Weltevreden from imported seafood. **Food Microbiology**, **25**: 29-35, 2008.
- POPOFF, M.Y. **Antigenic formulas of the Salmonella sorovars**. 8th edition. WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*. Institute Pasteur, Paris, France. 2001. 146p.
- POPOFF, M.Y., BOCKEMÜHL, J., GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (n° 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, **155**: 568-570, 2004.

- RAMAMURTHY, T., RAMESH, S., NATARAJAN, R. Incidence of three new *Salmonella* serotypes- *S. irumu*, *S. panama* & *S. lexington* from the south-east coast of India (Porto Novo). **Indian Journal of Medical Residence**, **81**: 558-560, 1985.
- REEVES, M.W., EVINS, G.M. HEIBA, A.A., PLIKAYTIS, B.D., FARMER, J.J.,III. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comp.nov. **Journal of Clinical Microbiology**, **27**: 313-320, 1989.
- REFSUM, T., HEIR, E., KAPPERRUD, G., VARDUND, T., HOLSTAD, D. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates determined by pulsed-field gel electrophoresis: Comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, **68**: 5600-5606, 2002.
- RIBEIRO, K.T.S. **Água e saúde humana em Belém**. Belém, Cejup, 2004 (Coleção megam/2). 280p.
- RIBEIRO, V.B., ANDRIGHETO, C., BERSOT, L.S., BARCELLOS, V., REIS, E.F., DESTRO, M. T. Serological and genetic diversity amongst *Salmonella* strains isolated in a salami processing line. **Brazilian Journal of Microbiology**, **38**: 178-182, 2007.
- RODRIGUES, A.S.De L. & MALAFAIA, G. Degradação dos recursos hídricos e saúde humana: uma atualização. **Revista Saúde e Ambiente**, **10**: 13-23, 2009.
- RODRÍGUEZ, M., DIEGO, De I., MARTÍNEZ, N., RODICIO, M.R., MENDOZA, M.C. Nontyphoidal *Salmonella* causing focal infections in patients admitted at a spanish general hospital during an 11-year period (1999-2001). **International Journal of Medical Microbiology**, **296**: 211-222, 2006.

- RUIZ, B.G.-V., ESPINAR, A.C., CARMONA, M.J.B. Comparative study of strains of *Salmonella* isolated from irrigation waters, vegetables and human infections. **Epidemiology and Infection**, **98**: 271-276, 1987.
- SAHLSTRÖNG, L., De JONG, B., ASPAN, A. *Salmonella* isolated in sewage sludge traced back to human cases of salmonellosis. **Letters in Applied Microbiology**, **43**: 46-52, 2006.
- SANDT, C.H., KROUSE, D.A., COOK, C.R., HACKMAN, A.L., CHMIELECKI, W.A., WARREN, N.G. The key role of pulsed-field gel electrophoresis in investigation of a large multiserotype and multistate food-borne outbreak of *Salmonella* infections centered in Pennsylvania. **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 3200-3208, 2006.
- SEARS, S.D., FERRECCIO, C., LEVINE, M.M., CORDANO, A.M., MONREAL, J., BLACK, R.E., D'OTTONE, K., ROWE, B., SCHUSTER, A., RODRIGUEZ, H., LOBOS, H., BORGONO, M., RISTORI, C. The use of moore swabs for isolation of *Salmonella* Typhi from irrigation water in Santiago, Chile. **The Journal of Infectious Diseases**, **149**: 640-642, 1984.
- SIRICHOTE, P., HASMAN, H., PULSRIKARN, C., SCHØNHEYDER, H. C., SAMULIONIENÉ, J., PORNRUANGMONG, S., BANGTRAKULNONTH, A., AARESTRUP, F.M., RENE S. HENDRIKSEN, R.S. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporinase-producing *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis isolates from patients in Thailand and Denmark. **Journal of Clinical Microbiology**, **48**: 883-888, 2010.
- SKERMAN, V.B.D., MCGOWAN, V., SNEATH, P.H.A. Approved list of bacterial names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, **30**: 225-420, 1980.

SMITH, P.J., JONES, F., WATSON, D.C. *Salmonella* pollution of surface waters.

Journal Hygiene, 81: 353-360, 1978.

STEVENS, A., KEROUANTON, A., MARAULT, M., MILLEMANN, Y., BRISABOIS, A., CAVIN, J.F., DUFOUR, B. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing.

International Journal of food Microbiology, 123: 191-197, 2008.

SWANSON, S.J., SNIDER, C., BRANDEN, C.R., BOXRUD, D., WÜNSCHMANN, A., RUDROFF, J.A., LOCKETT, J., SMITH, K. E. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents. **The New England Journal of Medicine, 356:** 21-28, 2007.

TAKAHASHI, J.A. & LUCAS, E.M.F. Revisão: Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova, 31:** 1807-1013, 2008.

TEIXEIRA, L.M., CARVALHO, M.Da G.S., MERQUIOR, V.L.C., STEIGERWALT, A.G., BRENNER, D.J., FACKLAM, R.R. Phenotypic and genotypic characterization of *Vagococcus fluvialis*, including strains isolated from human sources. **Journal of Clinical Microbiology, 35:** 2778-2781, 1997.

THONG, K.-L., CORDANO, A.-M., YASSIN, R.M., PANG, T. Molecular analysis of environmental and human isolates of *Salmonella* Typhi. **Applied and Environmental Microbiology, 62:** 271-274, 1996.

- TOZETTO, S.M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella enterica* no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 2006. 83p.
- TRABULSI, L.R., CAMPOS, L.C., LORENÇO, R. Salmoneloses. In: **Tratado de Infectologia.** Veronesi, R. & Focaccia, R. (eds). São Paulo, Atheneu, 2002. p. 856-863.
- TSAI, K.-S., YANG, Y.-J., WANG, S.-M., CHIOU, C.-S., LIU, C.-C. Change of serotype pattern of group D non-Typhoidal *Salmonella* isolated from pediatric patients in southern Taiwan. **Journal of Microbiology and Immunology of Infection, 40:** 234-239, 2007.
- UPPAL, B., KASHYAP, B., BHALLA, P. Enteric Pathogens in HIV/AIDS from a Tertiary Care Hospital. **Indian Journal of Community Medicine, 34:** 237-242, 2009.
- UZZAU, S., BROWN, D.J., WALLIS, T., RUBINO, S., LEORI, G., BERNARD, S., CASADESÚS, J., PLATT, D.J., OLSEN, J.E. Review: Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiology and Infection, 125:** 229-255, 2000.
- VAAGLAND, H., BLOMBERG, B., KRÜGER, C., NAMAN, N., JUREEN, R., LANGELAND, N. Nosocomial outbreak of neonatal *Salmonella enterica* serotype Enteritidis meningitis in a rural hospital in northern Tanzania. **BMC Infections Diseases, 4:** 1-5, 2004.
- VARNAM, A.H. & EVANS, M.G. **Foodborne Pathogens.** Mosby Year Book, USA, 1991. 557p.
- VAZ, C.S.L., STRECK, A.F., MICHAEL, G.B., MARKS, F.S., RODRIGUES, D.P., Dos REIS, E.M.F., CARDOSO, M.R.I., CANAL, C.W. Antimicrobial resistance

and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**, **89**: 1530-1536, 2010.

- ZAIDI, M.T.B., LEON, V., CANCHE, C., PEREZ, C., ZHAO, S., HUBERT, S.K., ABBOTT, J., BLICKENSTAFF, K., MCDERMOTT, P.F. Rapid and widespread dissemination of multidrug-resistant *bla*_{CMY-2} *Salmonella* Typhimurium in Mexico. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **60**: 398–401, 2007.
- YANG, Y.J., HUANG, M.C., WANG, S.M., WU, J.J., CHENG, C.P., LIU, C.C. Analysis of risk factors for bacteremia in children with nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **European Journal of Clinical Microbiology of Infectious Disease**, **21**: 290-293, 2002.
- YANG, B., QU, D., ZHANG, X., SHEN, J., CUI, S., SHI, Y., XI, M., SHENG, M., ZHI, S., MENG, J. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **International Journal of Food Microbiology**, **141**: 63-72, 2010.
- WEILL, F. -X., GUESNIER, F., GUIBERT, V., TIMI-NOUNI, M., DEMARTIN, M., POLOMACK, L., GRIMONT, P. A. D. Multidrug resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from humans in France (1993 to 2003). **Journal of Clinical Microbiology**, **44**: 700-708, 2006.
- WILKINS, E. G. & ROBERTS, C. Extraintestinal salmonellosis. **Epidemiology and Infection**, **100**: 361-368, 1988.
- WINFIELD, M. D. & GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, **69**: 3687-3694, 2003.

WINN Jr.W., ALLEN, S., JABDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G.,
SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. Koneman, diagnóstico microbiológico:
texto e atlas colorido, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2008. 1565p.