

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Isolamento de *Salmonella* sp. em ruminantes abatidos
em frigorífico de Pelotas, RS e avaliação da
suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos**

Tanise Pacheco Fortes

Pelotas, 2013

TANISE PACHECO FORTES

**Isolamento de *Salmonella* sp. em ruminantes abatidos em frigorífico de Pelotas,
RS e avaliação da suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de conhecimento: Veterinária Preventiva).

Orientador: Éverton Fagonde da Silva
Co-orientadora: Márcia de Oliveira Nobre

Pelotas, 2013.

Dados Internacionais de Publicação (CIP)

F738i Fortes, Tanise Pacheco
Isolamento de Salmonella sp. em ruminantes abatidos
em frigorífico de Pelotas, RS e avaliação da
susceptibilidade dos isolados a antimicrobianos / Tanise
Pacheco Fortes; Éverton Fagonde da Silva, orientador;
Márcia de Oliveira Nobre, co-orientador. - Pelotas,
2013.
60 f.

Dissertação (Mestrado em Mestrado em Medicina
Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1. Salmonelose. 2. Bovinos. 3. Búfalos. 4. Ilhas
genômicas. I. Silva, Éverton Fagonde da orient. II.
Nobre, Márcia de Oliveira co-orient. III. Título.

CDD: 636.089

Banca examinadora:

Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva (Orientador)

Prof. Dr. Fábio Pereira Leivas Leite

Prof. Dra. Helenice Gonzalez de Lima

Prof. Dra. Flávia Aleixo Vasconcellos

Para meus pais, pela compreensão e
amor incondicionais.

DEDICO.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelo amor, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos pela presença e às minhas sobrinhas por tornaram os dias mais divertidos.

À Débora pela grande amizade e conselhos valiosos.

Ao Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva pela confiança, compreensão e orientação durante o mestrado.

À Sandra, Talita e Karina pela participação ativa e valiosa em diferentes etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Cláudio Dias Timm e à equipe do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal pelo apoio.

À Universidade Federal de Pelotas, ao Programa de Pós Graduação em Veterinária e a CAPES pela oportunidade de realização deste trabalho.

E a todos que, de diferentes formas, colaboraram com a execução deste trabalho.

Resumo

FORTES, Tanise Pacheco. **Isolamento de *Salmonella* sp. em ruminantes abatidos em frigorífico de Pelotas, RS e avaliação da suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos.** 2013. 60f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

O Brasil possui um dos maiores rebanhos de ruminantes do mundo e destaca-se como um grande exportador de carne. Entretanto, para que a exportação brasileira de carne *in natura* e seus derivados seja consolidada é importante que o produto tenha segurança alimentar. Entre os micro-organismos usados como indicadores de segurança alimentar, *Salmonella* se destaca por causar muitas doenças em animais e humanos. Este estudo foi realizado com o objetivo de isolar *Salmonella* durante o abate de ruminantes em um frigorífico sob inspeção estadual, localizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, que utiliza medidas para o controle de qualidade. Cento e cinquenta amostras foram coletadas de três pontos diferentes do abate: couro do animal após a sangria (P1), carcaça após a evisceração (P2) e conteúdo cecal (P3). Os isolados foram testados quanto à suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* usando amoxicilina, ampicilina e ciprofloxacina. Como resultados, duas (1,33%) cepas foram isoladas de bovinos e classificadas como *Salmonella*. Nenhuma cepa foi isolada de búfalos. Os dois isolados apresentaram suscetibilidade à amoxicilina e à ciprofloxacina. Além da investigação da presença de *Salmonella* no fluxograma de ruminantes, foi realizada uma revisão sobre ilhas de patogenicidade em *Salmonella* (SPI). De acordo com os resultados, conclui-se que existe o risco da bactéria ser incorporada na linha de abate pelos ruminantes e, dessa forma, provocar a contaminação das carcaças. A implementação e a manutenção de medidas para o controle de qualidade nos estabelecimentos são importantes para prevenir ou reduzir o risco à saúde dos funcionários e consumidores.

Palavras-chave: Salmonelose. Bovinos. Búfalos. Ilhas genômicas.

Abstract

FORTES, Tanise Pacheco. **Isolamento de *Salmonella* sp. em ruminantes abatidos em frigorífico de Pelotas, RS e avaliação da suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos.** 2013. 60f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

Brazil has one of the largest commercial herd of the world and it is a great beef exporter. Meanwhile, for the consolidation of Brazilian exportation of meat *in natura* and its derivatives it is necessary that the products have food safety. Among the microorganisms used as indicators of food security, *Salmonella* has a special attention because it causes severe diseases to animals and humans. This study was developed with the objective to isolate *Salmonella* during the cattle slaughter in a state inspection slaughterhouse located in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul. A hundred and fifty samples were collected from three different points of slaughter: leather of the animal after bleeding (P1), the carcass after evisceration (P2) and cecum contents (P3). The isolates were tested for their antimicrobial susceptibility in vitro using amoxicillin, ampicillin and ciprofloxacin. As results, two (1,33%) strains were isolated from bovines and classified as *Salmonella*. No strain was isolated from buffalos. The two isolates were susceptible to amoxicillin and ciprofloxacin. Besides the investigation of the presence of *Salmonella* in the cattle flowchart, a review about *Salmonella* pathogenicity islands (SPI) was performed. According to the results, we conclude that there is the risk of incorporating the bacteria at the slaughter time by the ruminants, contaminating the carcasses. The implementation and maintenance of means to control the quality in the market facilities are important to prevent or reduce the health risk to employees and consumers.

Palavras-chave: Salmonellosis. Beef cattle. Buffalo. Genomic islands.

Lista de Tabelas

Tabela 1	Presença de <i>Salmonella</i> sp. (%) nas amostras coletadas em relação aos pontos de coleta	49
Tabela 2	Distribuição das amostras coletadas de acordo com a espécie animal	49
Tabela 3	Concentração inibitória mínima (CIM) da ampicilina, amoxicilina e ciprofloxacina frente aos isolados BO19 e BO25, através da técnica de microdiluição em caldo	50

Lista de Abreviaturas

°C – Graus Celsius

APT – Água peptonada tamponada

BHI – *Brain heart infusion* (caldo cérebro coração)

BPLS – Ágar verde brilhante vermelho de fenol lactose sacarose

CIM – Concentração inibitória mínima

DTA – Doença transmitida por alimentos

GI – *Genomic island* (ilha genômica)

MPI – *Major pathogenicity island* (ilha de patogenicidade principal)

ORF – *Open reading frame* (fase de leitura aberta)

PAI – *Pathogenicity island* (ilha de patogenicidade)

RVS – Caldo Rappaport-Vassiliadis

SCV – *Salmonella-containing vacuole* (vesículas que contém *Salmonella*)

SGI – *Salmonella* genomic island (ilha genômica de *Salmonella*)

SPI – *Salmonella* pathogenicity islands (ilha de patogenicidade da *Salmonella*)

T1SS – *Type 1 secretion system* (sistema de secreção tipo 1)

T3SS – *Type 3 secretion system* (sistema de secreção tipo 3)

TSA – Teste de sensibilidade a antimicrobianos

TT – Caldo tetratonato

XLD – Ágar xilose lisina desoxicolato

Sumário

1 Introdução Geral	11
2 Artigos	15
2.1 Ilhas de patogenicidade da <i>Salmonella enterica</i>: uma revisão	15
2.2 Isolamento de <i>Salmonella</i> em ruminantes abatidos em frigorífico de Pelotas (RS) e avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> dos isolados a antimicrobianos	39
3 Conclusões	51
Referências	52
Anexo	55

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui um rebanho de ruminantes estimado em 214 milhões de animais, e por isso, destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de carne e ao longo da última década tem se consolidado como uma potência na exportação de carne bovina (IBGE, 2011; ABIEC, 2012). No terceiro trimestre de 2012, o abate de bovinos atingiu a marca recorde de 8 milhões de cabeças abatidas (número mais alto na série histórica de abate de bovinos, que começou a ser divulgada em 1997) e as exportações aumentaram 16,9% frente ao segundo trimestre do mesmo ano (IBGE, 2012). Entretanto, para a consolidação da exportação brasileira de carne *in natura* e seus derivados a outros mercados, é fundamental que o produto tenha vida útil adequada e segurança microbiológica aceitável (DICKSON; ANDERSON, 1991).

Entre os patógenos veiculados por alimentos, destacam-se os do gênero *Salmonella* e a importância da disseminação deste patógeno vem sendo amplamente estudada na cadeia produtiva (SILVA; DUARTE, 2002). Salmonelas são patógenos intracelulares capazes de se replicar no interior das células epiteliais intestinais e de macrófagos, constituindo uma importante ameaça à saúde pública (MIAO; RAJAN, 2011). Assim como outras bactérias patogênicas, *Salmonella* entra na planta de abate a partir de animais vivos e de operários (LIMA et al., 2004). A contaminação da carcaça pode acontecer através do contato com o couro ou conteúdo fecal contaminado durante o trânsito no abatedouro (POINTON et al., 2012). A transmissão de *Salmonella* ao homem ocorre principalmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, como a carne, o que pode resultar em infecções alimentares (BOROWSKY et al., 2006).

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos que pertencem à família Enterobacteriaceae. *Salmonella*, como a maioria das enterobactérias, geralmente são móveis, não formadoras de esporos e anaeróbias facultativas (YAN

et al., 2003). O gênero *Salmonella* engloba duas espécies e mais de 2500 sorotipos descritos (CDC, 2007). Esta variabilidade antigênica tem dificultado a classificação das bactérias, gerando muita controvérsia até os dias de hoje (YAN et al., 2003). A última proposta relativa à taxonomia e nomenclatura propõe dividir o gênero *Salmonella* em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (TINDALL et al., 2005; KOERICH, 2007; DUNKLEY et al., 2009). *Salmonella enterica* é subdividida em seis espécies (I-VI): *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *housteane* (IV), e *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (YAN et al., 2003). A maioria dos isolados de humanos e de animais de sangue quente pertence à subespécie I, enquanto as outras subespécies e *S. bongori* costumam ser encontradas em animais de sangue frio (TINDALL et al., 2005). A diferenciação entre as subespécies pode ser realizada pelo uso do esquema sorológico de Kauffman-White ou através da hibridização do DNA cromossomal (YAN et al., 2003; DUFFY et al., 2012).

Embora métodos novos e mais rápidos como a hibridização do DNA, reação em cadeia da polimerase e ensaios imunomagnéticos para a detecção de *Salmonella* sejam reportados frequentemente, a bacteriologia convencional continua sendo a base para os protocolos de detecção da bactéria (DAVIS et al., 2000; TASKILA et al., 2012). O método de cultivo tradicional envolve as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, cultivo em agar seletivo, caracterização bioquímica dos isolados suspeitos e confirmação sorológica (SCHNEID et al., 2006). O meio de pré-enriquecimento usado com maior frequência é a água peptonada tamponada (APT), capaz de recuperar células injuriadas até uma condição fisiológica estável (MALORNY et al., 2004; TASKILA et al., 2012). Para a etapa de enriquecimento seletivo, o caldo Rappaport-Vassiliadis tem se mostrado desempenho superior ao de outros meios no enriquecimento de salmonela (TASKILA et al., 2012). A seletividade do meio é baseada na alta concentração de cloreto de magnésio (capaz de diminuir a atividade de água e agir como um inibidor para outras bactérias), baixo pH e alta concentração de verde malaquita (também é capaz de inibir o crescimento de outras bactérias) (TASKILA et al., 2012). O plaqueamento em agar seletivo é feito a partir dos caldos de enriquecimento seletivo em placas de Agar MacConkey, Agar Verde Brilhante, Agar Hektoen e/ou Agar Rambach (utilizar no mínimo dois meios seletivos-indicadores). Colônias com características compatíveis com *Salmonella* spp. são selecionadas e submetidas às provas bioquímicas e sorológica (BRASIL, 1995).

Depois da ingestão de água ou alimento contaminado, *Salmonella* é capaz de passar pelo estômago e penetrar no epitélio intestinal, localizando-se posteriormente nas camadas epiteliais mais profundas (OLIVEIRA, 2005; ABRAHAMS; HENSEL, 2006). Evidências indicam que a bactéria associa-se, preferencialmente, a macrófagos no interior das placas de Peyer, no íleo distal, induzindo a formação de ondas na superfície das células infectadas, nos sítios de entrada do micro-organismo (OLIVEIRA, 2005). Dependendo do sorovar e do hospedeiro infectado, a salmonela pode ser transportada pelos macrófagos para tecidos como fígado e baço, onde se multiplica e dissemina a infecção (YAN et al., 2003).

Um aspecto comum a todas as infecções por salmonela é a colonização do trato gastrointestinal, com eliminação fecal do micro-organismo, fornecendo uma fonte de infecção para animais e humanos (HUR et al., 2012). Em humanos, as salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e representam um grave problema de saúde pública (SOUZA et al., 2010; TASKILA et al., 2012). A apresentação clínica mais comum é gastroenterite com náusea, vômito e diarreia com ou sem febre (YAN et al., 2003). Nos animais, a salmonelose pode se apresentar clinicamente na forma entérica (localizada) com diarreia ou na forma generalizada, afetando vários sistemas, resultado de septicemia (GAMARRA, 2007). Os sintomas associados com a infecção por salmonela devem-se, em grande parte, à resposta do hospedeiro a invasão bacteriana e dos mecanismos que essa bactéria emprega para sobreviver e invadir a mucosa intestinal (HALLSTROM; MCCORMICK, 2011).

Um problema em potencial que se desenvolveu ao longo das décadas é o surgimento de cepas de salmonela resistentes aos antimicrobianos (HUR et al., 2012). O emprego de agentes antimicrobianos em animais destinados à alimentação humana é, supostamente, a principal causa de emergência e distribuição dessas cepas (SOUZA et al., 2010). Com isso, a caracterização dos perfis de resistência a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* tem assumido um papel importante, principalmente devido ao desenvolvimento de linhagens multi-resistentes em surtos alimentares (OLIVEIRA, 2005). No passado, as drogas mais comuns usadas para o tratamento de salmonelose foram a ampicilina, o cloranfenicol e o sulfametoxazol-trimetoprim (MUTHU et al., 2011). O surgimento de resistência a esses antimicrobianos reduziu significativamente seu uso e eles foram gradualmente substituídos por fluorquinolonas, como a ciprofloxacina (SOUZA et al., 2009).

Atualmente, o surgimento de cepas resistentes à ciprofloxacina constitui um grave problema de saúde pública, pois limita as opções disponíveis para o tratamento da infecção (LINDGREN et al., 2009; MUTHU et al., 2011).

Neste contexto, o objetivo geral do trabalho foi isolar *Salmonella* em diferentes pontos do abate de ruminantes, em frigorífico sob inspeção estadual na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul. Como objetivos específicos, destacam-se: (1) Isolar *Salmonella* em três diferentes pontos do abate de ruminantes; (2) Avaliar sua suscetibilidade *in vitro* dos isolados a três agentes antimicrobianos, a ampicilina, amoxicilina e ciprofloxacina, comumente usados para seu controle; e (3) Revisar a literatura sobre as ilhas de patogenicidade das salmonelas.

Inicialmente, apresentamos o artigo 1 que foi submetido ao periódico **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, onde destacamos os principais avanços no conhecimento das ilhas de patogenicidade das salmonelas (SPI) nos últimos vinte anos. Em seguida, apresentamos o artigo 2 o qual trata do isolamento de *Salmonella* sp. em ruminantes abatidos em frigorífico de Pelotas, RS e avaliação da suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. Este artigo foi formatado segundo normas do periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.

2 ARTIGOS

2.1 Artigo 1

Ilhas de patogenicidade da *Salmonella enterica*: uma revisão.

Tanise Pacheco Fortes¹, Michel Quevedo Fagundes², Flávia Aleixo Vasconcellos³,
Cláudio Dias Timm¹, Éverton Fagonde da Silva^{1*}

Artigo submetido à Revista do Instituto Adolfo Lutz

Ilhas de patogenicidade de *Salmonella enterica*: uma revisão.

Salmonella enterica pathogenicity islands: a review.

Tanise Pacheco FORTES¹, Michel Quevedo FAGUNDES², Flávia Aleixo VASCONCELLOS³, Cláudio Dias TIMM¹, Éverton Fagonde da SILVA^{1*}

***Endereço para a correspondência:** ¹Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Universitário Capão do Leão, Prédio 1. Caixa Postal 354. CEP 96010-900, Pelotas, RS. e-mail: efsilva@ufpel.edu.br

²Centro de Desenvolvimento Tecnológico, UFPel

³Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, UFPel

RESUMO

Salmonella é um bom modelo bacteriano para o estudo das interações entre hospedeiro e agente patogênico. Embora muitos de seus fatores de virulência tenham sido caracterizados, os mecanismos de especificidade aos hospedeiros com o desfecho na doença não estão elucidados. As ilhas de patogenicidade (PAI) são elementos genéticos dos cromossomos de um amplo número de agentes patogênicos. Nas salmonelas muitos dos fatores de virulência são codificados por genes presentes nas PAI, as quais são referidos como ilhas de patogenicidade da *Salmonella* (SPI). Nesta revisão são sumarizados os relatos na literatura específica dos últimos vinte anos sobre o papel das SPI na patogenia da doença, e como elas influenciam nos mecanismos envolvidos na invasão e colonização das bactérias patogênicas no hospedeiro.

Palavras-chave. *Salmonella enterica*, ilhas genômicas, salmoneloses.

ABSTRACT

Salmonella is a suitable bacterial model for conducting the study on the host-pathogen interactions. Although many virulence factors have been characterized, the host specificities mechanisms with disease outcome have not been fully elucidated yet. Pathogenic islands (PAI) are the genetic elements on the chromosomes of a large number of pathogens. In *Salmonella*, many of the virulence factors are encoded by genes on PAI, which are known as *Salmonella* pathogenicity islands (SPI). This review summarizes the reported investigations in the last twenty years regarding to the role of SPI in the disease pathogenesis, and their effects on the pathogen invasion and colonization mechanisms in the host.

Keywords. *Salmonella enterica*, genomic islands, salmonellosis.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* são consideradas a principal causa de doença transmitida por alimentos no mundo. As salmonelas são geralmente transmitidas para os humanos através do consumo de alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne, aves, ovos e leite¹. A estimativa feita pela Food and Drug Administration² é de que ocorram de 2 a 4 milhões de casos de salmonelose anualmente nos Estados Unidos.

Sorovares de *Salmonella* são patógenos intracelulares capazes de causar doenças em aves e mamíferos³. Duas características marcantes na patogenia da salmonelose são a invasão do hospedeiro e a proliferação intracelular, as quais estão diretamente ligadas a genes localizados nas ilhas de patogenicidade (PAI), elementos genéticos móveis que contribuem para rápidas mudanças no potencial de virulência⁴.

Assim como outros patógenos bacterianos, *Salmonella* abriga *clusters* de genes de virulência, os quais foram adquiridos através de transferência genética horizontal⁵. Estes genes de virulência encontram-se reunidos em ilhas genômicas (GI), que são consideradas

“saltos quânticos” na evolução bacteriana, podendo prover bases moleculares para o entendimento da patogênese da doença⁵. Além disso, acredita-se que os genes pertencentes aos plasmídios de virulência, operons de fímbrias, pseudogenes, fagos lisogênicos e ilhas de patogenicidade são importantes para conferir especificidade ao hospedeiro⁶.

Nesta revisão, resumizamos a literatura dos últimos vinte anos, com respeito ao papel das SPI na patogênese da doença, e como elas influenciam os mecanismos envolvidos na invasão e colonização dos patógenos no hospedeiro.

Ilhas de Patogenicidade

As ilhas de patogenicidade são um tipo particular de ilha genômica encontradas nas salmonelas e outros patógenos. Elas estão presentes somente em bactérias patogênicas e carregam um ou mais genes de virulência⁷. A elucidação da função e da distribuição destes genes presentes nas SPI nos sorovares de *Salmonella* pode prover um entendimento da evolução dos sorovares patogênicos e o papel das SPI na diferença de patogênese e epidemiologia entre os sorovares³.

As SPI codificam genes envolvidos na adesão de células do hospedeiro, invasão, sobrevivência dentro da célula, mecanismos de defesa do sistema imune e, ao menos em parte, na especificidade ao hospedeiro^{8,9,10,11}. Além disso, as SPI também são reconhecidas por contribuírem com a evolução genômica por transferência horizontal de genes em muitos patógenos bacterianos. Evidências indicam que elementos equivalentes em espécies não patogênicas, as ilhas genômicas, são importantes na evolução destas bactérias, influenciando traços como resistência a antibióticos, simbiose e adaptação em geral¹².

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 1 (SPI-1)

A ilha de patogenicidade 1 de *Salmonella* (SPI-1) é uma região de 40 Kb que forma uma inserção específica no cromossomo⁸. Os genes presentes nesta região foram identificados originalmente em cepas mutantes deficientes na invasão da célula hospedeira. Diferente da maioria das SPI, esta não está associada com genes de tRNA, uma das características que definem uma SPI⁸.

A principal função dos genes codificados por SPI-1 são de secreção do T3SS (*Type-3 Secretory System*). Porém, nem todos os genes localizados neste locus estão necessariamente relacionados com o T3SS. O *cluster* do gene *sit*, por exemplo, que codifica um sistema de captura de ferro, também está localizado em SPI-1. Historicamente, a função SPI-1 está associada à invasão de células não fagocíticas, uma característica de virulência importante de *S. enterica*. O T3SS codificado pela SPI-1 forma um apêndice na superfície celular no formato de uma agulha, o qual pode mediar a secreção de proteínas de *Salmonella* extracelular diretamente no citosol das células hospedeiras de eucariotos¹³. Estas proteínas chamadas de efetoras alteram as funções celulares do eucarioto e auxiliam na infecção, promovendo a invasão de células epiteliais não-fagocíticas e a iniciação da resposta inflamatória no intestino, além de estarem envolvidas na sobrevivência e persistência da bactéria no hospedeiro¹⁴.

Uma série de proteínas efetoras codificadas por SPI-1 e genes adicionais fora de SPI-1 são translocados dessa mesma forma. Um subgrupo destas proteínas efetoras modifica vias de transdução de sinais, resultando na reorganização temporal do citoesqueleto de actina na célula hospedeira. As proteínas SptP, SopE e SopE2 interferem com a função de proteínas celulares de uma família de pequenas GTPases do hospedeiro (Cdc42, Rac-1 e Rho) que regulam a formação de filamentos de F-actina e a dinâmica do citoesqueleto¹⁵.

Estas proteínas efetoras foram associadas com disrupções das *tight junctions*, sendo que SopB, SipA, SopE e SopE2 funcionam como fatores de troca de GTP, resultando na

ativação de Cdc42 e levando a formação de filamentos de actina no sítio de translocação destas proteínas efetoras¹⁵. A modificação localizada do citoesqueleto é seguida de mudanças dramáticas na superfície da célula hospedeira que se aparentam como ondulações na superfície da membrana. Como consequência, células não-fagocíticas como as epiteliais, internalizam grandes partículas como bactérias através de macropinocitose¹⁵. Foi demonstrado que a proteína efetora SptP possui um efeito antagonista pela sua função como fator ativador de GTPase. SptP pode mediar a inativação de Cdc42 e Rac-1, resultando na terminação da polimerização de actina e ondulamento da membrana¹⁶.

A translocação de proteínas efetoras de SPI-1 dentro de macrófagos pode induzir a formação rápida de um processo apoptótico. A proteína SipB codificada pela SPI-1 está envolvida na apoptose do macrófago pela ativação da caspase-1, a qual cliva a pró-IL-1B e pró-IL-18, precursores de citocinas pró-inflamatórias, uma função similar a IpaB de *Shigella* spp.¹⁷. Isto resulta também, na liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-8.

Outra função associada à SPI-1 é o controle da captura de *Salmonella* por células dendríticas. Um trabalho com mutantes em *invC*, gene que codifica uma ATPase envolvida na geração de energia para o T3SS, mostrou que estas células foram capturadas com maior eficiência em relação à cepa selvagem, mostrando que SPI-1 funcional controla o número de bactérias que adentram as células dendríticas. Este controle, juntamente com a modulação de citocinas pró-inflamatórias sugere que a função de modulação da resposta imune do hospedeiro é uma função de grande importância de SPI-1¹⁷.

Já o segundo subgrupo de proteínas efetoras de SPI-1 está relacionado com sintomas de diarreia. As proteínas efetoras SopA, SopB e SopD translocadas pelo sistema T3SS de SPI-1 são necessárias para este fenótipo. SopB é uma fosfatase de inositolfosfato, e sua atividade enzimática resulta na ativação de canais de cloro e perda de fluidos e eletrólitos no lúmen

intestinal¹⁸. As funções de SopA e SopD não são totalmente entendidas, mas ambos efetores contribuem para o fenótipo diarreico no modelo bovino de *S. Dublin*¹⁹.

As interações das proteínas codificadas por SPI-1 com o hospedeiro parecem variar muito conforme a cepa e o modelo de estudo. Trabalhos com cepas mutantes em diferentes modelos animais têm demonstrado incongruências entre a função do T3SS codificado por SPI-1, que se pensava ser exclusivamente de invasão celular. Por exemplo, no modelo galináceo, estudos com *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* com diferentes mutações em SPI-1 demonstraram que as proteínas codificadas por esta ilha têm um papel importante, mas não essencial na invasão tecidual²⁰. Mutantes de SPI-1 não impediram a colonização do ceco, sendo que no fígado e baço a invasão foi dependente de ambas SPI-1 e SPI-2^{14,20}. Já com *S. Gallinarium*, mutações em SPI-1 tiveram pouco efeito na virulência e nenhuma alteração na sobrevivência intracelular em macrófagos. Apesar disto, a sinalização pró-inflamatória e a infiltração heterófila foi dependente de SPI-1²¹.

No modelo porcino, foi demonstrado que a invasão de células epiteliais e a indução da inflamação no intestino são dependentes de SPI-1, mas a invasão nas tonsilas é independente de SPI-1²². Em células fagocíticas, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* mutantes em SPI-1 tiveram sua habilidade em invadir macrófagos drasticamente diminuída, com um aumento significativo da expressão de citocinas pró-inflamatórias, mostrando que SPI-1 é necessária não somente para invasão de macrófagos, mas para supressão da expressão prematura de citocinas pró-inflamatórias²³. Em modelo bovino, mutantes em SPI-1 apresentaram uma patologia nas alças ileais semelhante à cepa selvagem após a infecção com *S. Typhimurium*²⁴. No modelo murino, o principal modelo de estudo de salmonelose sistêmica pela sua semelhança com a febre tifóide de humanos, foi demonstrado que a contribuição de SPI-1 na patogenia está relacionada principalmente com a sobrevivência intracelular em macrófagos²⁵ e modulação da resposta inflamatória através dos receptores eucariotos Nod1 e Nod2²⁶.

Quanto à invasão, a expressão de SPI-1 é importante em estágios iniciais da doença, como a invasão de células do trato epitelial, mas parece não estar diretamente envolvida em estágios mais tardios como invasão de macrófagos hemofagocíticos²⁷. Interessantemente, foi demonstrado no modelo murino que cepas mutantes em SPI-1 e SPI-2 foram capazes de invadir e colonizar células de carcinoma de cólon, sugerindo que as proteínas codificadas por estas ilhas de patogenicidade não são essenciais para a colonização tumoral²⁸. Outro estudo demonstrava que SPI-2 era necessário para a colonização tumoral²⁹. Apesar de todas estas evidências, em um estudo utilizando um modelo de epitélio intestinal organotípico 3D, foi demonstrado que o T3SS codificado por SPI-1 não é necessário para a invasão de células intestinais²⁹.

Cepas mutantes de *S. Typhimurium* em SPI1, SPI2 e do flagelo foram capazes de invadir diferentes tipos celulares intestinais como enterócitos, células de Paneth e células M, mostrando que a invasão é um processo ativo de *Salmonella*, independente de T3SS. Entretanto, o T3SS de SPI-1 foi necessário para a replicação intracelular bacteriana no modelo 3D³⁰. Coletivamente, estes dados sugerem que o T3SS é dispensável para a invasão, mas é requerido para o crescimento intracelular. Estas diferenças na patogenia, juntamente com estudos filogenéticos que demonstram que genes presentes nas ilhas de patogenicidade evoluíram diferencialmente em função e estrutura sugerem que outro papel importante das SPI é determinar a especificidade ao hospedeiro das diferentes cepas de *Salmonella*³.

A regulação da expressão de SPI-1 é um processo complexo, o qual não é inteiramente entendido. Os genes codificadores do T3SS de SPI-1 são estreitamente regulados por uma rede de reguladores transcricionais que respondem a sinais ambientais e intracelulares. Os genes de SPI-1 são reprimidos em *Salmonella* intracelular e são expressos sob condições impostas aos patógenos pelo microambiente do hospedeiro como o ambiente intestinal. Tais

condições incluem níveis de oxigênio, osmolaridade, fase de crescimento, pH, presença de ácidos graxos voláteis de cadeia curta³¹.

SPI-1 codifica alguns reguladores transcricionais. HilA tem um papel de regulador principal no controle da expressão de genes da SPI-1. Este regulador ativa a expressão de genes que codificam o componente estrutural do T3SS de SPI-1, ativando a também a expressão do fator transcricional tipo-AraC InvF, envolvido na regulação da expressão de HilD e HilC que interagem com uma sequência de DNA adjacente do promotor de HilA, presumidamente bloqueando a ligação de um repressor neste local, e InvF controla a expressão de genes que codificam proteínas de substrato para SPI-1³².

A regulação de SPI-1 envolve cascata de ativações transcricionais nas quais HilD e HilC, HilA e InvF, agem sequencialmente para ativar genes T3SS. Inicialmente, HilD e HilC ligam-se a diversos sítios dentro do promotor de HilA e desreprimem a transcrição de HilA. Então, HilA liga-se aos sítios de transcrição de *invF* e *prgH*, ativando sua expressão. Um regulador de captura de ferro, Fur, modula a expressão de *hilD* através de sua ligação no BoxA, localizado adjacente do promotor de *hilD*³². Isto reflete o fato de que muitos sinais, tanto ambientais quanto intracelulares, afetam a expressão dos genes de SPI-1, através da modificação da atividade da proteína HilD. Esta cascata resulta na expressão de genes que codificam componentes do T3SS.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 2 (SPI-2)

Esta ilha de patogenicidade tem função essencial para a patogênese de *Salmonella*. O locus SPI-2 possui 40 Kb e está associado com o gene de tRNA *vallV*. No mesmo local, uma inserção de 9 Kb sem função de virulência foi detectado em *E.coli* K-12³³. SPI-2 possui uma estrutura de mosaico de pelo menos dois elementos genéticos. Uma porção de 25 Kb codifica o T3SS e tem um conteúdo de G+C de 43%. Outra porção de 15 Kb mostra uma composição

de G+C similar ao *core* genômico, e genes desta porção não são necessários a função de T3SS.

SP-2 está ligada à habilidade de *Salmonella* em sobreviver nas células fagocíticas e replicar-se dentro de vesículas nas células eucarióticas. A SPI-2 foi descoberta através do estudo de cepas mutantes que não conseguiam proliferar sistematicamente em camundongos infectados³³, assim como através da triagem de regiões específicas no genoma de *Salmonella*³⁴. Cepas mutantes deficientes no T3SS que codifica SPI-2 são altamente atenuadas na sua virulência⁹ e o uso destas cepas como vacina contra a febre tifóide têm sido avaliada.

Existem vários fenótipos celulares relacionados à SPI-2. A função de T3SS codificada por SPI-2 é necessária para a proteção do patógeno nas vesículas que contém *Salmonella* (SCV) contra os mecanismos da imunidade inata. Estudos têm mostrado que a função de SPI-2 previne a co-localização da oxidase fagocítica³⁵ e da síntese de óxido nítrico³⁶ dentro da SCV. Ambas as funções podem estar relacionadas com a modificação no tráfico da célula hospedeira³⁷. Como consequência, a *Salmonella* intracelular fica protegida de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativos e contra a atividade antimicrobiana do peroxinitrito, o qual é gerado por reações de intermediários de nitrogênio e oxigênio reativos. Estes mecanismos de defesa representam uma adaptação específica ao ambiente intracelular, especialmente dentro de células fagocíticas.

Assim como no caso de SPI-1, o modelo animal estudado mostra diferenças importantes na função de SPI-2. Em camundongos, a virulência de *S. Enteritidis* é exclusivamente dependente de SPI-2. Através de estudos com cepas mutantes, foi demonstrado que mutantes de SPI-2 não são capazes de replicar-se em macrófagos²⁵, modulam a intensidade da inflamação tecidual juntamente com SPI-1²⁶ e causam depleção de

células NK no baço e no sangue³⁸. Já em bovinos e galináceos, mutantes em diferentes loci de SPI-2 causaram a atenuação da virulência de *Salmonella*²⁴.

A expressão dos genes T3SS de SPI-2 é induzida em *Salmonella* intracelular e a expressão é controlada positivamente pelo sistema de dois componentes SsrAB⁴ e negativamente pela interação Ella^{Ntr}-SsrB que controla os níveis basais de expressão de SPI-2³⁹. A proteína efetora SifA, codificada por um locus fora de SPI-2, é translocada pelo T3SS codificado em SPI-2, e esta proteína é necessária para manter a integridade da membrana fagocítica da SCV durante a proliferação intracelular. Diversas proteínas codificadas em SPI-2 são secretadas e translocadas nas células hospedeiras⁴. Para a SpiC, codificada por SPI-2, foi demonstrada funções de translocação e interferência no tráfico intracelular³⁷. Entretanto, também há evidência de que SpiC é um componente funcional do T3SS³⁷.

O locus SPI-2 é estável e parece ser conservado entre vários sorovares de *S. enterica*. A SPI-1 está presente em *S. enterica* assim como em *S. bongori*, enquanto que a SPI-2 foi somente detectada em *S. enterica*, sugerindo uma recente aquisição^{33,34}. A aquisição de SPI-2 é considerada um passo evolucionário em direção a colonização sistêmica de hospedeiros de sangue quente. Uma característica comum de ambas SPI-1 e SPI-2 é que somente um subgrupo de proteínas efetoras que são translocadas é codificado por genes dentro da ilha de patogenicidade. De fato, a maioria dos efetores é codificada em *loci* distintos espalhados através do cromossomo⁴⁰.

Muitos destes *loci* estão associados com genes de bacteriófagos. Tanto SPI-1 quanto SPI-2 evoluíram em regiões estáveis do genoma de *Salmonella*, e estes *loci* codificam um T3SS e um pequeno número de proteínas efetoras. A maior parte das proteínas efetoras é codificada por genes localizados fora de SPI-1 e SPI-2. A associação frequente de *loci* efetores com bacteriófagos indica que estes genes efetores codificam um pool de fatores de virulência altamente dinâmico e móvel⁴¹. A combinação de genes efetores em diferentes

sorovares de *Salmonella* spp. pode contribuir para a especificidade ao hospedeiro dos vários sorotipos assim como para o desenvolvimento da doença⁴¹.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 3 (SPI-3)

A organização genética e funcional de SPI-3 é diferente de SPI-1 e SPI-2. Esta SPI está inserida no gene de tRNA *SelC*, um locus que serve de local de inserção de SPI em cepas de *E. coli* patogênicas. Este locus possui cerca de 17 Kb, com uma composição de bases semelhante ao *core* genômico¹⁰. Dois fragmentos de elementos de inserção estão localizados na região central de SPI-3, e o conteúdo de G+C de genes dentro deste locus é variado. Além disso, SPI-3 mostra uma estrutura heterogênea nas diferentes subespécies de *Salmonella*¹⁰.

O principal fator de virulência codificado por SPI-3 é um sistema de transporte de alta afinidade com Magnésio (MgtCB), o qual é importante para o fenótipo de *Salmonella* intracelular. Para a replicação intracelular, a bactéria precisa adaptar-se ao ambiente microbicida e pobre em nutrientes do fagossomo, o qual é limitado em purinas, pirimidinas, alguns aminoácidos e Mg^{2+} . Um número grande de vias metabólicas e sistemas de transporte é necessário para a adaptação a este ambiente⁴².

Cepas mutantes deficientes no sistema MgtCB são incapazes de proliferação intracelular e virulência sistêmica. Os sistemas MgtB e MgtC estão localizados na membrana citoplasmática. Enquanto que MgtB é um transportador de Magnésio⁴³, a função de MgtC ainda não é clara. Outro suposto fator de virulência é o gene *misL*, que codifica um suposto T5SS com similaridade ao *VirG* de *Shigella flexneri* e a adesina AIDA-1 de EPEC¹⁰. O papel de *misL* e outros genes codificados dentro da SPI-3 ainda não foi elucidado, tendo sido sugerido que diferenças genômicas e funcionais entre SPI-3 entre sorovares podem ter implicações na especificidade de funções no hospedeiro⁴⁴.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 4 (SPI-4)

A SPI-4 foi inicialmente identificada usando uma abordagem para procurar segmentos de DNA que estavam presentes em *Salmonella* Typhimurium, mas ausentes em *E. coli* K-12 e poderiam constituir SPI⁴⁵. SPI-4 é uma inserção de 27 kb e está localizada adjacente ao gene *ssb* tRNA-like³³. Como SPI-3, SPI-4 possui estrutura em mosaico. As fases de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) possuem baixo conteúdo G+C quando comparado ao cromossomo de *Salmonella*, enquanto as regiões intergênicas possuem alto conteúdo G+C⁴⁶.

O papel de SPI-4 na virulência de *Salmonella* ainda não foi completamente esclarecido, mas muitos fatores de virulência estão presentes, como o T1SS e ORFs similares a toxinas RTX³³. Genes da SPI-4 são necessários para a fase intestinal da doença pela codificação de adesinas não fimbriais²⁰. SPI-4 codifica um T1SS para a adesina não fimbrial SiiE, que media o contato íntimo da bactéria com os microvilosidades da membrana apical. SiiE é necessária para adesão da *Salmonella* às células epiteliais polarizadas¹¹.

O estabelecimento de contato próximo é um pré-requisito para subsequente invasão mediada pela translocação de proteínas efetoras comandada pelo T3SS codificado pela SPI-1⁴⁷. A adesão às células epiteliais mediada por SPI-4 pode ser um requerimento funcional para a subsequente translocação de proteínas efetoras mediada por SPI-1, resultando em inflamação e respostas inflamatórias¹¹. Sem a adesão mediada pela secreção de SiiE, *Salmonella* é quase incapaz de ativar a remodelação do citoesqueleto celular mediada pela SPI-1 levando à absorção do patógeno¹¹.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 5 (SPI-5)

SPI-5 é um pequeno locus de 7,6 kb que está inserido adjacente ao tRNA *serT*. SPI-5 codifica proteínas efetoras para os T3SS codificados por SPI-1 e SPI-2. SopB é translocado pelo T3SS codificado pela SPI-1 e a expressão de *sopB* é controlada por HilA, o regulador de transcrição central de SPI-1³³. SopB é uma inositol fosfatase cuja atividade produz 1,4,5,6-

tetraquifosfato inositol, uma molécula sinalizadora que promove a secreção de cloreto, associada ao influxo de fluído e aos sintomas de diarreia⁴⁶. Em contraste, PipB é um efetor translocado pelo T3SS codificado por SPI-2 sob o controle do sistema SsrAB³³.

SPI-5 possui estrutura de mosaico. O gene *sopB* está presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies de *Salmonella enterica*. Ainda existe uma diferença na composição básica de diferentes porções de SPI-5, suportando a hipótese de aquisição independente de dois elementos no tRNA *serT*³³. Como observado para outras proteínas efetoras, a presença de genes codificando proteínas efetoras se correlaciona com a presença de SPI codificando T3SS cognatos³³. SPI-5 parece estar associada com enteropatogênese: mutações em *Salmonella* Dublin *pipD* (proteína codificada pela SPI), *sopB* (proteína exterior de *Salmonella*), *pipB* ou *pipA* tem efeito mínimo nas infecções sistêmicas em ratos, mas mostra marcadas respostas secretórias em modelos bovinos⁴⁶. Em contraste, PipB é o efetor translocado pelo T3SS codificado pela SPI-2 sob o controle do sistema SsrAB³³.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 6 (SPI-6) ou *Salmonella Chromosomal Island* (SCI)

Um locus de 59 kb no genoma do sorovar Typhi foi chamado SPI-6 e subsequentemente SCI para o sorovar Typhimurium. SPI-6 está inserida adjacente ao gene *aspV* tRNA e contém o gene *saf* para fimbrias, *pagN* que codifica uma invasina e muitos genes de função desconhecida³³. O locus SCI foi detectado em *Salmonella enterica* subespécie I, e a presença de porções de SCI no locus *aspV* tRNA de isolados das subespécies IIIb, IV e VII foi tomada como uma indicação para a estrutura em mosaico desta SPI. Existe uma sintonia parcial entre SPI-6 e a PAI OI#7 de *E. coli* enteroemorrágica que também está associada ao gene *aspV* tRNA. Outros homólogos de SPI-6 foram identificados nas sequência genômicas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Yersinia pestis*, mas a função destes homólogos

nestes patógenos não é conhecida³³. Apesar de SPI-6 codificar muitos genes de virulência, o papel dessa ilha de *Salmonella* em animais ainda não foi elucidado⁴⁵.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 7 (SPI-7) ou *Major Pathogenicity Island* (MPI)

SPI-7 possui 133 kb de tamanho e está inserida adjacente ao tRNA *phe*³³. SPI-7 é um locus específico para os sorovares Typhi, Dublin e Paratyphi C³³ e sua estrutura em forma de mosaico compreende regiões implicadas na virulência⁴⁸. Um importante fator de virulência codificado pela SPI-7 é o antígeno Vi, um exopolissacarídeo capsular. O fago *sopE* que codifica a proteína efetora SopE do T3SS-SPI1 está presente em SPI7. Outro fator de virulência é o pilus IVB codificado pelo grupo de genes *pil*³³.

A organização genômica de SPI-7 é bastante complexa e indica que este locus é composto de diferentes elementos adquiridos horizontalmente. A presença dos genes *pil*, *tra* e *sam* indica que SPI-7 se originou de um plasmídeo conjugativo ou transposon conjugativo. Pickard et al⁴⁹, demonstraram que uma porção de SPI-7 está presente em outras bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* SG17M. Além disso, a perda do fenótipo capsular Vi pode ser observada em isolados do sorovar Typhi, sugerindo instabilidade do locus SPI-7, o qual não está presente nos sorotipos que causam diarreia inflamatória³³.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 8 (SPI-8)

Esta ilha foi identificada durante o sequenciamento do genoma do sorovar Typhi CT18 e é um segmento de DNA com 6,8 kb⁴⁵. O locus está localizado adjacente ao gene *pheV* tRNA e os fatores de virulência são bacteriocinas. A presença de um gene codificando uma integrase indica a mobilidade deste elemento³³. SPI8 parece ser específica para o sorovar Typhi, mas sua distribuição ainda não foi investigada em detalhes³³.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 9 (SPI-9)

SPI-9 possui organização similar à SPI-4 e codifica quatro genes, três deles homólogos àqueles requeridos para o T1SS⁴⁵. Os fatores de virulência codificados pelo SPI-9 são um T1SS e uma grande proteína RTX-like³³. Este *locus* também está presente no cromossomo do sorovar Typhimurium. Partes de SPI-9 e do genoma bacteriófago adjacente também estão presentes em sequências genômicas incompletas de outros sorovares e de *Salmonella bongori*, indicando uma distribuição conservada desta ilha³³.

Ilha de Patogenicidade da *Salmonella* - 10 (SPI-10)

SPI-10 é uma grande inserção de 32,8 kb localizada no tRNA *leuX*. Os fatores de virulência codificados por SPI-10 são fímbrias Sef³³. A distribuição das fímbrias Sef é restrita a um subconjunto de sorovares, como Typhi e Enteritidis e é considerada como um fator que determina a especificidade ao hospedeiro⁴⁵.

Ilha Genômica de *Salmonella* -1 (SGI-1)

O surgimento de cepas resistentes atualmente é um grande problema associado com as infecções por *Salmonella*. A caracterização dos fatores de resistência desses isolados levou à identificação de uma ilha genômica em cepas multi-resistentes de *Salmonella enterica* sorovares Typhimurium DT 104, Paratyphi B e Agona³³. Esse locus chamado de ilha genômica 1 da *Salmonella* (SGI-1) é uma ilha genômica de 43 kb que tem 44 ORF, muitas com homologias a genes conhecidos e outros com funções desconhecidas.

Os genes de resistência a antibióticos estão localizados em um segmento de 13 kb da SGI-1⁵⁰. Na SGI-1, genes que conferem o fenótipo de penta-resistência (i.e. resistência a tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina e sulfonamidas) estão localizados na região de resistência a multi-drogas, que é composta por dois integrons. Além disso, um

retrofago oculto foi identificado em SGI-1. Em contraste a resistência a antibióticos adquirida por plasmídeos, a SGI-1 cromossomal parece ser estável na ausência de pressão seletiva³³.

A presença de SGI-1 em *Salmonella* Typhimurium DT104 pode ser associada com o surgimento mundial e epidêmico de cepas multi-resistentes. Genes associados com a mobilidade de DNA como transposases, integrases e excisionases com sequências similares a genes transposon foram detectados na SGI-1. Variantes da SGI-1 foram identificados em outros sorovares nas mesmas localizações cromossômicas, indicando transferência horizontal e recombinação sítio-específica³³.

Independente da origem de SGI-1, o possível mecanismo para criação das variações na resistência é por recombinação homóloga entre segmentos idênticos de DNA⁴⁵. O gene *floR* (responsável pela resistência a cloranfenicol/florfenicol) é relacionado ao gene de resistência ao cloranfenicol (*cmlA*) conhecido por estar localizado num plasmídeo conjugativo de *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, esse gene contém um conteúdo diferente de G+C do que aquele no cromossomo de *Salmonella* indicando que eles podem ter sido adquiridos horizontalmente⁵⁰.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste artigo de revisão, destacamos os principais avanços no conhecimento das ilhas de patogenicidade das salmonelas (SPI) nos últimos vinte anos. A análise criteriosa dos dados disponíveis sugere que as SPI são requeridas, individualmente ou de forma sinérgica, para a colonização de órgãos humanos e animais, por apresentarem importantes fatores de virulência na patogênese da doença. Não há consenso sobre o real papel ou a forma exata da participação das ilhas de patogenicidade na patogênese das infecções por *Salmonella* spp. Estudos adicionais devem ser realizados com os antígenos das SPI, com o intuito de testar a sua

capacidade de conferir proteção em modelo animal, no diagnóstico e como alvos para epidemiologia molecular durante a investigação de surtos.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e pela concessão das bolsas de estudo aos três primeiros autores (T.P.F, M.Q.F., F.A.V.).

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Health topics Salmonella. [acesso 2011 Aug 30]. Disponível em: [<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>].
2. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION [FDA]. *Salmonella* spp. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook, 2009. [acesso 2011 Ago 20]. Disponível em: [<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm069966>].
3. Eswarappa SM, Janice J, Nagarajan AG, Balasundaram SV, Karnam G, Dixit NM, Chakravorty D. Differentially Evolved Genes of *Salmonella* Pathogenicity Islands: Insights into the Mechanism of Host Specificity in *Salmonella*. PLoS ONE. 2008; 3: e3829.
4. Kuhle V, Hensel M. Cellular microbiology of intracellular *Salmonella* enterica: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. Cell Molec Life Sci. 2004; 61 (22): 2812-26.
5. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? FEMS Immun Med Microbiol. 2005; 43: 1-11.

6. Amavisit P, Lightfoot D, Browning GF, Markham PF. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* Pathogenicity Islands. *J Bacteriol.* 2003; 185 (12): 3624-35.
7. Rabsh WHL, Andrews RA, Kingsley RP, Prager R, Tschape H, Adams LG, Baumler AJ. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. *Infect Immun.* 2002; 70: 2249-55.
8. Mills DM, Bajaj V, Lee CA. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol.* 1995; 15: 749–59.
9. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella* Typhimurium. *PNAS.* 1996; 93: 2593–7.
10. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella Enterica*. *J Bacteriol.* 1999; 181: 998– 1004.
11. Gerlach RG, Jackel D, Stecher B, Wagner C, Lupas A. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesion and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol.* 2007; 9: 1834-50.
12. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Rev Microbiol.* 2004; 2: 414-24.
13. Kubori, T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara TM, Sukhan A, Galan JE, Aizawa SI. Supramolecular structure of the *Salmonella* Typhimurium type III protein secretion system. *Science.* 1998; 280: 602–5.
14. Dieye Y, Ameiss K, Mellata M, Curtis III R. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) 1 contributes more than SPI2 to the colonization of the chicken by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 3.

15. Hardt WD, Chen LM, Schuebel KE, Bustelo XR, Galan JE. *S. Typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell*. 1998; 93: 815–26.
16. Fu Y, Galan JE. A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature*. 1999; 401: 293–7.
17. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghori N, Falkow S, Zychlinsky A. The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *PNAS*. 1999; 96: 2396–401.
18. Norris FA, Wilson MP, Wallis TS, Galyov EE, Majerus PW. SopB, a protein required for virulence of *Salmonella* Dublin, is an inositol phosphate phosphatase. *PNAS*. 1998; 95: 14057–9.
19. Jones MA, Wood MW, Mullan PB, Watson PR, Wallis TS, Galyov EE. Secreted effector proteins of *Salmonella* Dublin act in concert to induce enteritis. *Infect Immun*. 1998; 66: 5799–804.
20. Rychlik I, Karasova D, Sebkova A, Volf J, Sisak F, Havlickova H, Kummer V, Imre A, Szmolka A, Nagy B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. *BMC Microbiol*. 2009; 9: 268.
21. Jones MA, Wigley P, Page KL, Hulme SD, Barrow PA. *Salmonella enterica* Serovar Gallinarum Requires the *Salmonella* Pathogenicity Island 2 Type III Secretion System but Not the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System for Virulence in Chickens. *Infect Immun*. 2001; 69: 5471–6.
22. Boyen F, Pasmans F, Immerseel FV, Morgan E, Adriaensen C, Hernalsteens J, Decostere A, Ducatelle R, Haesebrouck F. *Salmonella* Typhimurium SPI-1 genes promote intestinal but not tonsillar colonization in pigs. *Microb Infect*. 2006; 8: 2899–907.

23. Pavlova B, Volfi J, Ondrackova P, Matiasovic J, Stepanova H, Crhanova M, Karasova D, Faldyna M, Rychlik I. SPI-1-encoded type III secretion system of *Salmonella enterica* is required for the suppression of porcine alveolar macrophage cytokine expression. *Vet Res.* 2011; 42: 16.
24. Coombes BK, Coburn BA, Potter AA, Gomis S, Mirakhur K, Li Y, Finlay BB. Analysis of the Contribution of *Salmonella* Pathogenicity Islands 1 and 2 to Enteric Disease Progression Using a Novel Bovine Ileal Loop Model and a Murine Model of Infectious Enterocolitis. *Infect Immun.* 2005; 73: 7161-9.
25. Silva-Herzog E, Detweiler CS. *Salmonella enterica* Replication in Hemophagocytic Macrophages Requires Two Type Three Secretion Systems. *Infect Immun.* 2010; 78: 3369-77.
26. Geddes K, Rubino S, Streutker C, Cho JH, Magalhães JG, Bourhis LL, Selvanantham T, Girardin SE, Philpott D. Nod1 and Nod2 Regulation of Inflammation in the *Salmonella* Colitis Model. *Infect Immun.* 2010; 78: 5107-15.
27. Aiastrui A, Pucciarelli MG, Portillo FG. *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium Invades Fibroblasts by Multiple Routes Differing from the Entry into Epithelial Cells. *Infect Immun.* 2010; 78: 2700-13.
28. Crull K, Bumann D, Weiss S. Influence of infection route and virulence factors on colonization of solid tumors by *Salmonella* Enterica serovar Typhimurium. *FEMS Immun Med Microbiol.* 2011; 62: 75–83.
29. Pawelek JM, Sodi S, Chakraborty AK, Platt JT, Miller S, Holden DW, Hensel M, Low KB. *Salmonella* pathogenicity island-2 and anticancer activity in mice. *Cancer Gene Therapy.* 2002; 9: 813–8.

30. Radtke AL, Wilson JW, Sarker S, Nickerson CA. Analysis of Interactions of *Salmonella* Type Three Secretion Mutants with 3-D Intestinal Epithelial Cells. PLoS ONE. 2010; 5: e15750.
31. Durant JA, Corrier DE, Ricke SC. Short-chain volatile fatty acids modulate the expression of the hilA and invF genes of *Salmonella* Typhimurium. J Food Protect. 2000; 3: 573–8.
32. Saini S, Ellermeier JR, Slauch JM, Rao CV. The Role of Coupled Positive Feedback in the Expression of the SPI1 Type Three Secretion System in *Salmonella*. PLoS Path. 2010; 6: e1001025.
33. Hensel M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. Int J Med Microbiol. 2004; 294: 95-102.
34. Ochman H, Soncini FC, Solomon F, Groisman EA. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. PNAS. 1996; 93: 7800–4.
35. Vazquez-Torres A, Xu Y, Jones-Carson J, Holden DH, Lucia SM, Dinauer MC, Mastroeni P, Fang FC. *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. Science. 2000; 287: 1655–8.
36. Chakravorty D, Hansen-Wester I, Hensel M. *Salmonella* pathogenicity island 2 mediates protection of intracellular *Salmonella* from reactive nitrogen intermediates. J Exp Med. 2002; 195: 1155–66.
37. Uchiya K, Barbieri MA, Funato K, Shah AH, Stahl PD, Groisman EA. A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. EMBO J. 1999; 18: 3924–33.
38. Karasova D, Sebkova A, Havlickova H, Sisak F, Volf J, Faldyna M, Ondrackova P, Kummer V, Rychlik I. Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. BMC Microbiol. 2010; 10: 75.

39. Choi J, Shin D, Yoon H, Kim J, Lee C, Kim M, Seok Y, Ryu S. *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIINtr–SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *Proc Nat Acad*. 2010; 107, 20506-11.
40. Miao EA, Miller SI. A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella* Typhimurium. *PNAS*. 2000; 97:7539–44.
41. Figueroa-Bossi N, Uzzau S, Maloriol D, Bossi L. Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol*. 2001; 39: 260–71.
42. Garcia-del Portillo F, Foster JW, Maguire ME, Finlay BB. Characterization of the micro-environment of *Salmonella* Typhimurium-containing vacuoles within MDCK epithelial cells. *Mol Microbiol*. 1992; 6: 3289–97.
43. Snavely MD, Miller CG, Maguire ME. The *mgtB* Mg²⁺transport locus of *Salmonella* Typhimurium encodes a P-type ATPase. *J Biol Chem*. 1991; 266: 815–23.
44. Retamal P, Castillo-Ruiz M, Villagra NA, Morgado J, Mora GC. Modified Intracellular-Associated Phenotypes in a Recombinant *Salmonella* Typhi Expressing S. Typhimurium SPI-3 Sequences. *PLoS ONE*. 2010; 5: e9394.
45. Morgan E. *Salmonella* Pathogenicity Islands. In: Rhen M, Maskell D, Mastroeni P, Threlfall J. *Salmonella* Molecular Biology and Pathogenesis. Horizon Bioscience; 2007. p. 67-87.
46. Marcus SL, Brummel JH, Pfeifer CG, Finlay BB. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. *Microb infect*. 2000; 2: 145-56.
47. Wagner C, Polke M, Gerlach RG, Linke D, Stierhof Y, Schwarz H, Hensel M. Functional dissection of SiiE, a giant non-fimbrial adhesion of *Salmonella enterica*. *Cell Microbiol*. 2011; 13: 1286-301.

48. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev. 2004; 17 (1): 14-56.
49. Pickard D, Wain J, Baker S, Line A, Chohan S, Fookes M, Barron A, Gaora PO, Chabalgoity JA, Thanky N, Scholes C, Thomson N, Quail M, Parkhill J, Dougan G. Composition, Acquisition, and Distribution of the Vi Exopolysaccharide-Encoding *Salmonella enterica* Pathogenicity Island SPI7. J Bacteriol. 2003; 185 (17): 5055-65.
50. Mulvey MR, Boyd DA, Olson BD, Cloeckert A. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. Microb Infect. 2006; 8: 1915-22.

2.2 Artigo 2

Isolamento de *Salmonella* em ruminantes abatidos em frigorífico de Pelotas (RS) e avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos isolados a antimicrobianos

T.P. Fortes¹; G.B. Machado¹; S.V. Moura¹; K. Colonetti²; H. G. Lima¹; M. O. Nobre¹;
É.F. Silva¹

Artigo científico a ser submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina
Veterinária e Zootecnia
(Normas da revista em Anexo)

Isolamento de *Salmonella* em ruminantes abatidos em frigorífico de Pelotas (RS) e avaliação da suscetibilidade *in vitro* dos isolados a antimicrobianos

Salmonella isolation from ruminant slaughtered in abattoir of Pelotas (RS) and evaluation of *in vitro* susceptibility of isolates to antimicrobial

T.P. Fortes¹; G.B. Machado¹; S.V. Moura¹; K. Colonetti²; H. G. Lima¹; M. O. Nobre¹; É.F. Silva^{1*}

¹Programa de Pós-graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, RS

²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, RS

Resumo

O Brasil possui um dos maiores rebanhos de ruminantes comerciais do mundo e destaca-se como um grande exportador de carne. Entretanto, para que a exportação brasileira de carne *in natura* e seus derivados a outros mercados seja consolidada é de fundamental importância que o produto tenha segurança alimentar. Entre os micro-organismos usados como indicadores dessa segurança alimentar, *Salmonella* se destaca por causar muitas doenças em animais e humanos. Este estudo foi realizado com o objetivo de isolar *Salmonella* durante o abate de ruminantes em um frigorífico sob inspeção estadual, localizado na cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, o qual utiliza medidas para o controle de qualidade. Cento e cinquenta amostras foram coletadas de três pontos diferentes do abate, como o couro do animal após a sangria (P1), carcaça após a evisceração (P2) e conteúdo cecal (P3). Os isolados foram testados quanto a suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* usando amoxicilina, ampicilina e ciprofloxacina. Como resultados, duas (1,33%) cepas foram isoladas de bovinos e classificadas como *Salmonella*. Nenhuma cepa foi isolada de búfalos. Os dois isolados apresentaram alta suscetibilidade à amoxicilina e à ciprofloxacina. De acordo com os resultados, conclui-se que existe o risco da bactéria ser incorporada na linha de abate pelos ruminantes e, dessa forma, provocar a contaminação das carcaças. A implementação e a manutenção de medidas para o controle de qualidade nos estabelecimentos são importantes para prevenir ou reduzir o risco à saúde dos funcionários e consumidores.

Palavras-chave: *Salmonella*, ruminantes, antimicrobianos.

ABSTRACT

Brazil has one of the largest commercial cattle of the world and it is a great beef exporter. Meanwhile, for the consolidation of Brazilian exports of meat *in natura* and its derivatives it is necessary that the products have food security. Among the microorganisms used as indicators of food security, *Salmonella* has a special attention because it causes severe diseases to animals and humans. This study was developed with the objective of isolating *Salmonella* during the cattle slaughter in a state inspection slaughterhouse located in the city of Pelotas, Rio Grande do Sul, which has means to control the quality. A hundred and fifty samples were collected from three different points of slaughter: the hide of the animal after bleeding (P1), the carcass after evisceration (P2) and cecum contents (P3). The isolates were tested for their antimicrobial susceptibility in vitro using amoxicillin, ampicillin and ciprofloxacin. As results, two (1,33%) strains were isolated from bovines and classified as *Salmonella*. No strain was isolated from buffalos. The two isolates presented high susceptibility to amoxicillin and ciprofloxacin. According to the results, we conclude that there is the risk of incorporating the bacteria at the slaughter time by the ruminants and, this way, contaminating the carcasses. The implementation and maintenance of means to control the quality in the market facilities are important to prevent or reduce the health risk to employees and consumers.

Key-words: *Salmonella*, ruminants, antimicrobial.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui um rebanho de ruminantes estimado em 214,1 milhões de animais, sendo 212,8 milhões bovinos e 1,3 milhões bubalinos, e destaca-se como um dos maiores exportadores de carne mundiais (IBGE, 2011; ABIEC, 2012). Entretanto, para a consolidação da exportação brasileira de carne *in natura* e seus derivados a outros mercados, é fundamental que o produto tenha vida útil adequada e segurança microbiológica aceitável (DICKSON; ANDERSON, 1991).

Entre os micro-organismos importantes para a segurança alimentar, *Salmonella* tem se destacado como grande causadora de infecções alimentares, sendo por isso utilizada como um indicador da segurança alimentar por diversos países (BESSA et al., 2004). *Salmonella* é um

dos mais importantes patógenos transmitidos por alimentos e está associada com muitas doenças em animais e humanos (YE et al., 2011).

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos que compõem o grupo mais complexo das enterobactérias, são anaeróbias facultativas e as formas móveis possuem flagelos peritríquios (KONEMAN et al., 2001; HUR et al., 2012). Assim como outras bactérias patogênicas presentes na superfície de carcaças de ruminantes, *Salmonella* entra na planta de abate a partir de animais vivos e de operários, não existindo procedimentos de inspeção especificamente direcionados para o seu controle (LIMA et al., 2004). A transmissão da *Salmonella* ao homem pode ocorrer pelo contato direto com animais, tanto nas granjas quanto nos frigoríficos, mas principalmente devido à ingestão de alimentos contaminados (SILVA, 2011).

Depois da ingestão, a *Salmonella* é capaz de sobreviver ao pH ácido do estômago e colonizar o epitélio intestinal (ABRAHAMAS; HENSEL, 2006). Dependendo do sorovar e do hospedeiro infectado, a bactéria é capaz de invadir macrófagos no interior das placas de Peyer, no íleo distal, de onde é transportada para tecidos como fígado e baço, onde se multiplica, disseminando a infecção (YAN et al., 2003; OLIVEIRA, 2005).

Em humanos, as salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e representam um grave problema de saúde pública (SOUZA et al., 2010). A apresentação clínica mais comum é a gastroenterite com náusea, vômito e diarreia, com ou sem febre (YAN et al., 2003). Frequentemente, as infecções causadas por salmonela requerem terapia com antimicrobianos para serem eliminadas (HUR et al., 2012) e fluorquinolonas como a ciprofloxacina são comumente usadas para tratar infecções severas por *Salmonella* em humanos (RAVEENDRAN et al., 2008; CDC, 2010). Um problema que tem sido observado ao longo das décadas é o desenvolvimento de resistência de cepas de *Salmonella* aos antimicrobianos (HUR et al., 2012). Dessa maneira, a caracterização dos perfis de resistência a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* tem assumido um papel importante para a saúde pública (OLIVEIRA, 2005).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi determinar a presença de *Salmonella* em três diferentes pontos do abate de bovinos e bubalinos, além de avaliar sua suscetibilidade a três agentes antimicrobianos comumente usados para seu controle.

MATERIAIS E MÉTODOS:

Amostras

Cento e cinquenta amostras foram coletadas de três pontos distintos (P1= couro do animal após a sangria, P2= carcaças após a evisceração, e P3= conteúdo cecal) do abate de bovinos (75) e búfalos (75), no período entre abril e setembro de 2012. As amostras foram coletadas com o auxílio de swab estéril, identificadas e conservadas sob refrigeração para serem transportadas até o laboratório, onde eram processadas em até 24 horas.

Processamento das amostras

As amostras foram incubadas em água peptonada tamponada (APT), por 24 horas a 37°C, para recuperar células injuriadas até uma condição fisiológica estável. De cada amostra pré-enriquecida em APT, foram retiradas alíquotas de 1mL e 0,1mL inoculadas em caldo Tetrationato (TT) e Rappaport-Vassiliadis (RVS), respectivamente. Os caldos TT e RVS foram incubados em banho-maria a 42°C por 24 horas. Alíquotas provenientes do enriquecimento seletivo foram semeadas em Agar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Agar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS). Ambos os meios foram incubados por 24-48 horas a uma temperatura de 37°C. Colônias que apresentaram características compatíveis com *Salmonella* spp. foram submetidas a provas bioquímicas e sorológica, com soro *Salmonella* Polivalente Somático (Probac).

Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

Os isolados foram testados quanto à suscetibilidade frente à ciprofloxacina (Isofarma), ampicilina (Novafarma) e amoxicilina (Bayer) através da técnica de microdiluição em caldo descrita no documento NCCLSM7A6. A partir da solução mãe dos fármacos, foram realizadas seis diluições. Os inóculos bacterianos, referentes aos isolados testados, foram preparados a partir de colônias isoladas no Agar XLD e cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI), a 37°C por 24 horas. Passado este tempo, a turbidez dos inóculos bacterianos foi ajustada a 0,5 McFarland controle positivo (preenchida com caldo BHI e inóculo bacteriano) e para o controle negativo (contendo caldo BHI e antibiótico). As microplacas foram incubadas a 37°C por 18 horas, quando foi realizada a leitura da concentração inibitória mínima (CIM). A leitura da CIM foi realizada visualmente para comprovar a turvação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Das 150 amostras analisadas, verificou-se a presença de *Salmonella* spp. em 2 (1,33%), conforme indicado na Tabela 1. As duas amostras onde *Salmonella* estava presente

eram provenientes do conteúdo cecal dos animais. De acordo com Costa (2010), nas fezes de ruminantes a ocorrência deste micro-organismo costuma variar entre 0,2 e 5,5%.

Salmonella não foi encontrada em nenhuma das 50 carcaças analisadas. Resultados semelhantes foram observados por Fontoura (2006) e Gandra (2011), que não encontraram *Salmonella* em nenhuma das amostras provenientes de carcaças. A presença de *Salmonella* spp. em carcaças de ruminantes varia de acordo com uma série de fatores que incluem desde as condições climáticas, o manejo com os animais até as condições de abate e armazenamento das carcaças (COSTA, 2010).

A bactéria também não foi encontrada nas amostras provenientes do couro dos animais, contrastando com os resultados encontrados por Barkocy-Gallagher et al. (2003) e Rivera-Betancourt et al. (2004), que detectaram *Salmonella* numa frequência de 97,7% e 70,8%, respectivamente. Barkocy-Gallagher et al. (2003) também relacionaram a frequência de isolamento do micro-organismo a partir do couro com o período do ano, sendo que nos meses mais frios a frequência de isolamento de *Salmonella* (27,7%) foi menor do que aquela encontrada nos meses mais quentes (97,7%). Para a realização deste estudo, as amostras foram coletadas durante o outono e o inverno, o que pode ter influenciado na ausência do micro-organismo no couro do animal. Quanto à espécie animal, *Salmonella* foi isolada apenas de amostras provenientes de bovinos, conforme os dados expostos na Tabela 2.

Detectar *Salmonella* spp. nos animais que chegam ao frigorífico significa um fator de risco, mas não pode ser interpretada como um índice de contaminação do produto final. Entretanto, quanto maior for o índice de animais que chegarem portadores e/ou excretores de *Salmonella* no momento de abate, maior será a dificuldade de controlar os pontos críticos na indústria (BESSA et al., 2004).

A concentração inibitória mínima (CIM) para a ampicilina, amoxicilina e ciprofloxacina para os isolados provenientes de bovinos pode ser vista na Tabela 3. De acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI, BO19 foi sensível aos 3 antibióticos testados, enquanto BO25 foi sensível à amoxicilina e à ciprofloxacina, mas apresentou resistência à ampicilina.

O estudo de Raveendran et al. (2008) sugere que a ciprofloxacina não pode mais ser considerada a droga de escolha no tratamento de infecções por *Salmonella* em razão do seu elevado nível de resistência.

No estudo conduzido por Souza et al. (2010), todas as cepas testadas foram suscetíveis à ciprofloxacina e 0,5% foram resistentes à ampicilina. Nas amostras isoladas de bovinos

durante o abate, todos os isolados encontrados foram sensíveis à ciprofloxacina e 11,4% foram resistentes à ampicilina (LOPES, 2011).

CONCLUSÕES

Estudos enfatizando a epidemiologia de animais assintomáticos podem levar a um melhor entendimento do ciclo da contaminação de *Salmonella* nos ruminantes. Os resultados observados no estudo demonstram uma atividade *in vitro* da amoxicilina e da ciprofloxacina frente aos isolados.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro e pela concessão das bolsas de estudo.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. **Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. Disponível em: http://www.abiec.com.br/download/Relatorioexportacao2012_jan_out.pdf. Acesso em: 23 novembro de 2012.

ABRAHAM, G. L.; HENSEL, M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. **Cell. Microbiol.**, n.8, p.728-737, 2006.

BARKOCY-GALLAGHER, G. A.; ARTHUR, T. M.; RIVERA-BETANCOURT, M.; NOU, X.; SHACKELFORD, S. D.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M. Seasonal prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157 serotypes, and *Salmonella* in commercial beef processing plants. **Journal of Food Protection**, v.66, n.11, p.1978-1986, 2003.

BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, n.2, p.80-84, 2004.

CDC. **Salmonella surveillance: annual summary, 2006**. Atlanta, Georgia: US. Department of Health and Human Services, CDC, 2010.

COSTA, C. A. R. **Avaliação da exposição do consumidor à *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., e *Escherichia coli* produtora de toxina Shiga em produtos cárneos refrigerados comercializados no município de São Paulo**. 2010. 127f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

DICKSON, J. S.; ANDERSON, M. E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. **Journal of Food Protection**, v.55, n.2, p.133-140, 1991.

FONTOURA, C. L. **Estudo microbiológico em carcaças bovinas e influência da refrigeração sobre a microbiota contaminante**. 2006. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

GANDRA, T. K. V. **Identificação de pontos de contaminação por *Salmonella* spp. e por indicadores de qualidade higiênico-sanitária no abate e processamento de bovinos**. 2011. 114f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: a review. **Food Research International**, n.45, p.819-830, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Pecuária Municipal 2011**. Prod. Pec. Munic., Rio de Janeiro, v.39, p.1-63, 2011.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. 5 ed. São Paulo: MEDSI Editora Médica Científica, 2001. 1488p.

LIMA, E. S. C.; PINTO, P. S. A.; SANTOS, J. L.; VANETTI, M. C. D.; BAVILACQUA, P. D.; ALMEIDA, L. P.; PINTO, M. S.; DIAS, F. S. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo de abate suíno como subsídio ao sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC. **Pesq. Vet. Bras.**, n.24, v.4, p.185-190, 2004.

LOPES, J. T. ***Salmonella* spp na cadeia de produção de carne bovina de exportação: ocorrência, perfil de suscetibilidade antimicrobiana, genes de virulência e perfil de macrorrestrição por PFGE.** 2011. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLIVEIRA, F. A. **Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-ribotipificação e RAPD de *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos ocorridas no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002.** 2005. 95f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre.

RAVEENDRAN, R.; WATTAL, C.; SHARMA, A.; OBEROI, J. K.; PRASAD, K. J.; DATTA, S. High level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* isolated from blood. **Indian J. Med. Microbiol.**, n.26, p.50-53, 2008.

RIVERA-BETANCOURT, M.; SHACKELFORD, S. D.; ARTHUR, T. M.; WESTMORELAND, K. E.; BELLINGER, G.; ROSSMAN, M.; REAGAN, J. O.; KOOHMARAIE, M. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* in two geographically distant commercial beef processing plants in the United States. **Journal of Food Protection**, v.67, n.2, p.295-302, 2004.

SILVA, F. F. P. **Investigação de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças bovinas durante o processamento em abatedouro-frigorífico.** 2011. 59f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias.** v.31, n.2, p. 413-428, 2010.

- 271 YAN, J. J.; KO, W. C.; CHIU, C. H.; TSAI, S. H.; WU, H. M.; JIN, Y. T.; WU, J. J.
272 Emergence of ceftriaxone-resistant *Salmonella* isolates and rapid spread of plasmid-encoded
273 CMY-2-like cephalosporinase, Taiwan. **Emerg. Infect. Dis.**, n.9, p.323-328, 2003.
274
- 275 YE, Y.; WU, Q.; ZHANG, J.; LU, J.; LIN, L. Isolation of *Salmonella* from Meat Samples and
276 Characterization by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain
277 Reaction and Antibiotics Test. **Foodborne Pathogens and Disease**. v.8, n.8, p.935-937,
278 2011.
279
280

281 Tabela 1. Presença de *Salmonella* spp. (%) nas amostras coletadas em relação aos pontos de
 282 coleta.

Pontos de coleta	Nº de amostras	Nº de isolados	%
P1	50	0	0
P2	50	0	0
P3	50	2	4
TOTAL	150	2	1,33

P1 = couro do animal após a sangria

P2 = carcaça após a evisceração

P3 = conteúdo cecal

283

284

285

286 Tabela 2. Distribuição das amostras coletadas de acordo com a espécie animal.

Pontos de coleta	Nº de amostras		Nº de isolados	
	Bovinos	Bubalinos	Bovinos	Bubalinos
P1	25	25	0	0
P2	25	25	0	0
P3	25	25	2	0
TOTAL	75	75	2	0

287

288

289

290

291 Tabela 3. Concentração inibitória mínima (CIM) da ampicilina, amoxicilina e ciprofloxacina
 292 frente aos isolados BO19 e BO25, através da técnica de microdiluição em caldo.

Isolado	Concentração inibitória mínima (µg/ml)		
	Ampicilina	Amoxicilina	Ciprofloxacina
B019	15,62	7,81	1
B025	31,25	≤1,95	0,5

Ponto de corte da ampicilina: Sensível ≤ 8 ; intermediário = 16; e resistente ≥ 32 .

Ponto de corte da amoxicilina: Sensível ≤ 8 ; intermediário = 16; e resistente ≥ 32 .

Ponto de corte da ciprofloxacina: Sensível ≤ 1 ; intermediário = 2; e resistente ≥ 4 .

3 CONCLUSÕES

- As ilhas de patogenicidade são necessárias para a invasão e colonização de órgãos humanos e animais por bactérias do gênero *Salmonella*. Além disso, os fatores de virulência importantes e que contribuem na patogênese da salmonelose estão associados às SPIs. Entretanto, ainda são necessários mais estudos para esclarecer de forma exata a participação das SPIs na patogênese de *Salmonella*.
- O número de cepas de *Salmonella* isoladas do conteúdo cecal de bovinos no frigorífico estudado foi de 1,33%.
- A cepa BO19 é sensível aos três antibióticos testados, enquanto BO25 é sensível à amoxicilina e à ciprofloxacina, mas apresenta resistência à ampicilina.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE - ABIEC. **Exportações Brasileiras de Carne Bovina**. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/download/Relatorioexportacao2012_jan_out.pdf>. Acesso em: 23 nov. de 2012.
- ABRAHAMMS, G. L.; HENSEL, M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. **Cell. Microbiol.**, n.8, p.728-737, 2006
- BOROWSKY, L. M.; BESSA, M. C.; CARDOSO, M. I.; AVANCINI, C. A. M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodofor. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1474-1479, 2006.
- BRASIL. Portaria Nº 126 de 03 de novembro de 1995. Normas de credenciamento e monitoramento de laboratórios de diagnóstico das salmoneloses aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasil, p.176-194, 6 de novembro de 1995, seção 1.
- CDC. ***Salmonella* surveillance: annual summary, 2006**. Atlanta, Georgia: US. Department of Health and Human Services, CDC, 2007.
- DAVIS, P. R.; TURKSON, P. K.; FUNK, J. A.; NICHOLS, M. A.; LADELY, S. R.; FEDORKA-CRAY, P. J. Comparison of methods for isolating *Salmonella* bacteria from faeces of naturally infected pigs. **Journal of Applied Microbiology**, v.89, p.169-177, 2000.
- DICKSON, J. S.; ANDERSON, M. E. Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. **Journal of Food Protection**, v.55, n.2, p.133-140, 1991.
- DUFFY, L. L.; DYKES, G. A.; FEGAN, N. A review of the ecology, colonization and genetic characterization of *Salmonella enterica* serovar Sofia, a prolific but avirulent poultry serovar in Australia. **Food Research International**, n.45, p.770-779, 2012.
- DUNKLEY, K. D.; CALLAWAY, T. R.; CHALOVA, V. I.; MCREYNOLDS, J. L.; HUME, M. E.; DUNKLEY, C. S.; KUBENA, L. F.; NISBET, D. J.; RICKE, S. C. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. **Anaerobe**, n.15, p.26-35, 2009.
- GAMARRA, R. M. **Identificação de pontos críticos para *Salmonella* spp no abate de suínos**. 2007. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- HALLSTROM, K.; MCCORMICK, B. A. *Salmonella* interaction with and passage through the intestinal mucosa: through the lens of the organism. **Frontiers in microbiology**, v.2, 2:88, 2011.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: a review. **Food Research International**, n.45, p.819-830, 2012.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Pecuária Municipal 2011**. Prod. Pec. Munic., Rio de Janeiro, v.39, p.1-63, 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Estatística da Produção Pecuária: Setembro de 2012**. Indicadores IBGE, 2012.

KOERICH, P. K. V. **Detecção de *Salmonella* em reprodutoras de frango: comparação entre real time PCR e dois métodos microbiológicos (semi-sólido Rappaport-Vassiliadis e duplo enriquecimento)**. 2007. 42f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas.

LIMA, E. S. C.; PINTO, P. S. A.; SANTOS, J. L.; VANETTI, M. C. D.; BAVILACQUA, P. D.; ALMEIDA, L. P.; PINTO, M. S.; DIAS, F. S. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo de abate suíno como subsídio ao sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle – APPCC. **Pesq. Vet. Bras.**, n.24, v.4, p.185-190, 2004.

LINDGREN, M. M.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; HURME, S.; LUKINMAA, S.; WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. V.; SIITONEN, A.; HAKANEN, A. Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* isolates from travelers, Finland. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.5, p.809-812, 2009.

MALORNY, B.; PACCASSONI, E.; FACH, P.; BUNGE, C.; MARTIN, A.; HELMUTH, R. Diagnostic Real-Time PCR for detection of *Salmonella* in food. **Applied Environmental Microbiology**, n.70, p.7046-7052, 2004.

MIAO, E. A.; RAJAN, J. V. *Salmonella* and caspase-1: a complex interplay of detection and evasion. **Frontiers in microbiology**, v.2, 2011.

MUTHU, G.; SURESH, A.; SUMATHY, G.; SRIVANI, R. Studies on antimicrobial susceptibility pattern of *Salmonella* isolates from Chennai, India. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.2, n.2, p. 435-442, 2011.

OLIVEIRA, F. A. **Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-ribotipificação e RAPD de *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos de doenças veiculadas por alimentos ocorridas no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002**. 2005. 95f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre.

POINTON, A.; KIERMEIER, A.; FEGAN, N. Review of the impact of pre-slaughter feed curfews of cattle, sheep and goats on food safety and caracase hygiene in Australia. **Food control**, n.26, p.313-321, 2012.

SCHNEID, A. S.; RODRIGUES, K. L.; CHEMELLO, D.; TONDO, E. C.; AYUB, M. A. Z.; ALEIXO, J. A. G. Evaluation of an indirect ELISA for the detection of *Salmonella* in chicken meat. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.37, p.350-355, 2006.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Avícola**. v.4, n.2, p.85-100, 2002.

SOUZA, R. B.; FERRARI, R. G.; MAGNANI, M.; KOTTWITZ, L. B. M.; ALCOCER, I.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.41, p.497-500, 2009

SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**. v.31, n.2, p.413-428, 2010.

TASKILA, S.; TUOMOLA, M.; OJAMO, H. Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. **Food Control**, n.26, p.369-377, 2012.

TINDALL, B. J.; GRIMONT, P. A.; GARRIT, Y. G. M.; EUZEBY, J. P. Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. **International Journal System Evolution Microbiology**, n.55, p.521-524, 2005.

YAN, J. J.; KO, W. C.; CHIU, C. H.; TSAI, S. H.; WU, H. M.; JIN, Y. T.; WU, J. J. Emergence of ceftriaxone-resistant *Salmonella* isolates and rapid spread of plasmid-encoded CMY-2-like cephalosporinase, Taiwan. **Emerg. Infect. Dis.**, n.9, p.323-328, 2003.

ANEXO

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Política Editorial

O periódico *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science)*, ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ) citado como *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao ABMVZ.

Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <www.abmvz.org.br>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis nos endereços www.scielo.br/abmvz ou www.abmvz.org.br.

Orientação para tramitação de artigos

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do ABMVZ no endereço www.abmvz.org.br.
- Apenas o autor responsável pelo artigo deverá preencher a ficha de submissão, sendo necessário o cadastro do mesmo no Sistema.
- Toda comunicação entre os diversos atores do processo de avaliação e publicação (autores, revisores e editores) será feita exclusivamente de forma eletrônica pelo Sistema, sendo o autor responsável pelo artigo informado, automaticamente, por e-mail, sobre qualquer mudança de status do artigo.
- A submissão só se completa quando anexado o texto do artigo em Word e em pdf no campo apropriado.
- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridas no texto e também enviadas, em separado, em arquivo com extensão jpg em alta qualidade (mínimo 300dpi),

zipado, inserido no campo próprio.

- Tabelas e gráficos não se enquadram no campo de arquivo zipado, devendo ser inseridas no corpo do artigo.
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no mesmo submetido.
- O ABMVZ comunicará via eletrônica a cada autor, a sua participação no artigo. Caso, pelo menos um dos autores não concorde com sua participação como autor, o artigo será recusado.

Tipos de artigos aceitos para publicação:

- **Artigo científico**

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 30.

- **Relato de caso**

Contempla principalmente as áreas médicas, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Filiação, Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 10, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

- **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental, dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo científico.

O texto, com título em português e em inglês, Autores e Filiação deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para “Artigo científico”, embora seguindo aquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um “Abstract” e quando redigida em inglês deve conter um “Resumo”.

O número de páginas não deve exceder a 8, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

Preparação dos textos para publicação

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal. Para ortografia em inglês recomenda-se o *Webster's Third New International Dictionary*. Para ortografia em português adota-se o *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*, da Academia Brasileira de Letras.

Formatação do texto

- O texto deve ser apresentado em Microsoft Word, em formato A4, com margem 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), em fonte Times New Roman tamanho 12 e em espaçamento entrelinhas 1,5, em todas as páginas, com linhas numeradas.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

Seções de um artigo

- **Título.** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 150 dígitos.
- **Autores e Filiação.** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a que pertencem. O autor para correspondência e seu e-mail devem ser indicados com asterisco.

Nota:

1. o texto do artigo em Word deve conter o nome dos autores e filiação.
 2. o texto do artigo em pdf **não** deve conter o nome dos autores e filiação.
- **Resumo e Abstract.** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 2000 dígitos incluindo os espaços, em um só parágrafo. Não repetir o título e incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação. Atenção especial às conclusões.
 - **Palavras-chave e Keywords.** No máximo cinco.
 - **Introdução.** Explicação concisa, na qual são estabelecidos brevemente o problema, sua pertinência e relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, suficientes para balizá-la.
 - **Material e Métodos.** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Não usar subtítulos. Nos trabalhos que envolvam animais e organismos geneticamente modificados deverá constar, obrigatoriamente, o número do protocolo de aprovação do Comitê de Bioética e/ou de Biossegurança, quando for o caso.
 - **Resultados.** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.
 - ✓ **Tabela.** Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Tab., mesmo quando se referir a várias tabelas. Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (menor tamanho aceito é 8).

- ✓ **Figura.** Qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema, etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e é referida no texto como Fig., mesmo se referir a mais de uma figura. As fotografias e desenhos com alta qualidade em formato jpg, devem ser também enviadas, em um arquivo zipado, no campo próprio de submissão.

Nota:

- ✓ Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.
- ✓ As tabelas e figuras devem preferencialmente, ser inseridas no texto no parágrafo seguinte à sua primeira citação.
- **Discussão.** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer das partes).
- **Conclusões.** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada.
- **Agradecimentos.** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.
- **Referências.** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética. Evitar referenciar livros e teses. Dar preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. São adotadas as normas ABNT/NBR-6023 de 2002, adaptadas conforme exemplos:

Como referenciar:

1. Citações no texto

- Citações no texto deverão ser feitas de acordo com ABNT/NBR 10520 de 2002. A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:
 - ✓ autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88)
 - ✓ dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974)
 - ✓ mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979)
 - ✓ mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.
- **Citação de citação.** Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências, deve-se incluir apenas a fonte consultada.

- *Comunicação pessoal.* Não fazem parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

2. Periódicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):
ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Publicação avulsa (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostrídios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte.* 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Documentos eletrônicos (até 4 autores, citar todos. Acima de 4 autores citar 3 autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critical6.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Nota:

- Artigos que não estejam rigorosamente dentro das normas acima não serão aceitos para avaliação.
- O Sistema reconhece, automaticamente, como “Desistência do Autor” artigos em diligência ou “Aguardando diligência do autor”, que não tenha sido respondido no prazo dado pelo Sistema.

Taxas de submissão e de publicação:

- **Taxa de submissão.** A taxa de submissão de R\$30,00 deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal. Somente artigos com taxa paga de submissão serão avaliados.
Caso a taxa não seja quitada em até 30 dias será considerado como desistência do autor.
- **Taxa de publicação.** A taxa de publicação de R\$70,00, por página impressa em preto e R\$220,00 por página impressa em cores será cobrada do autor indicado para correspondência, por ocasião da prova final do artigo. A taxa de publicação deverá ser paga por meio de boleto bancário emitido pelo sistema eletrônico de submissão de artigos. Ao solicitar o boleto bancário, o autor informará os dados para emissão da nota fiscal.

Recursos e diligências:

- No caso de o autor encaminhar resposta a diligências solicitadas pelo ABMVZ, ou documento de recurso, o mesmo deverá constar como a(s) primeira(s) página(s) do texto do artigo somente na versão em Word.
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso, o mesmo deve ser feito pelo e-mail journal@vet.ufmg.br.