



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Milka Carvalho de Azevêdo

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de
Salmonella spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos
cl clinicamente saudáveis no submédio São Francisco**

Petrolina – PE
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Milka Carvalho de Azevêdo

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de
Salmonella spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos
cl clinicamente saudáveis no submédio São Francisco**

Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco, UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa

Co-orientador: Prof.Dr. Mauricio Claudio Horta

Petrolina – PE
2012

A994c Azevedo, Milka Carvalho de
Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos clinicamente saudáveis no submédio São Francisco/ Milka Carvalho de Azevêdo. -- Petrolina, 2012.
61f.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, PE, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Co-orientador: Dr. Maurício Claudio Horta

1. Caprinos - ovinos. 2. *Escherichia coli*. 3. *Salmonella* spp. I.
Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco
CDD 636.39089

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca
SIBI/UNIVASF

Bibliotecário: Lucídio Lopes de Alencar

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Milka Carvalho de Azevêdo

**Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de
Salmonella spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos
cl clinicamente saudáveis no submédio São Francisco**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof^ª. Dra. Francesca Silva Dias Nobre
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof^ª.Dra. Gisele Veneroni Gouveia
Universidade Federal do Vale do São Francisco

Petrolina, 03 de agosto de 2012.

Dedico à minha amada mãe, Gorettinha, amor da minha vida e ao meu esposo Maurício, meu querido e amado companheiro.

AGRADECIMENTOS

À Deus, minha razão de viver, por seu amor infinito, por iluminar meus passos, por estar sempre ao meu lado, me dando forças para vencer os obstáculos e para nunca desanimar nem desistir dos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa, meu orientador, pela oportunidade, pela orientação, pelos ensinamentos, pelos conselhos, pela confiança e pela compreensão ao longo desta caminhada. Obrigada por tudo.

Ao meu esposo, Maurício, meu querido companheiro, fundamental na realização deste sonho, com seu amor, paciência, auxílio na produção deste trabalho e ensinamentos.

À Jennifer Figueiredo, minha parceira de trabalho, por sua dedicação, paciência e auxílio constante no experimento. Você foi fundamental.

À Ceíça e Chirles, por sua contribuição fundamental. Obrigada por tudo.

À minha mãe, Gorette, minha Goretinha, amor da minha vida, por seu amor e carinho constante. Obrigada por investir na minha educação e acreditar no meu sucesso profissional. Seu exemplo de vida me faz querer ser uma pessoa melhor.

Ao meu pai, José, por todo amor, toda dedicação e investimento em minha vida profissional. Muito obrigada por acreditar em mim!

À minha irmã, Karyne, pelo amor, carinho e torcida.

Aos colegas que me ajudaram nas coletas, em especial aos ICs Jr Jamila, Junior, Jonieudes e as estudantes de medicina veterinária Renatinha, Isabel, Juliana, e Andreina. Muito obrigada.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, *Campus* Ciências Agrárias da Univasf: Izabela, Marielly, Jusciene, Carina, Wellington, Samira, Gisele, Luciana, Jamile, Tatiane, Alan, Naedja, Verônica, Samilly, Mariana, Clerison, Marcelo, Valdenice, Jarbas, Rodolfo, Márcia, Gilvan, Grace, por toda ajuda, companheirismo e amizade durante meu experimento.

Aos colegas da pós-graduação Francimária, Jorge, Augusto, Nilmara, Carla Samantha, pelo incentivo e amizade.

Aos professores da pós-graduação em Ciência Animal, pela contribuição intelectual.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela oportunidade.

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Aos funcionários do *Campus* de Ciências Agrárias da UNIVASF.

A todos os professores e colegas do programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*"Aprender é a única coisa de que a mente
nunca se cansa, nunca tem medo e nunca
se arrepende."*

Leonardo da Vinci

RESUMO

Na região nordeste do Brasil, a caprino-ovinocultura é uma importante atividade sócio-econômica, com destaque para a agricultura familiar. O presente trabalho objetivou determinar a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos clinicamente saudáveis na região do submédio São Francisco, através de testes fenotípicos e genotípicos, além de determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos. Foram coletadas amostras de fezes de 720 animais, sendo 430 ovinos e 190 caprinos, em 12 propriedades no município de Petrolina (PE) e de 100 animais, sendo 50 caprinos e 50 ovinos, no Abatedouro Municipal de Petrolina, PE. O isolamento de *Salmonella* spp. foi realizado em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD), Ágar Bismuto e Ágar Hectoen, e de *Escherichia coli* em ágar MacConkey. As análises fenotípicas foram realizadas através de testes bioquímicos e as genotípicas através da reação pela cadeia da polimerase (PCR). Realizou-se teste de sensibilidade aos antimicrobianos nos isolados de *Salmonella* spp. Após a análise dos testes fenotípicos, verificou-se que 83,3% (10/12) das propriedades, além do abatedouro, apresentaram colônias suspeitas para *Salmonella* spp. Em todas as amostras foram isoladas *E.coli*, confirmadas por testes bioquímicos. Nos animais provenientes das propriedades, 31,5% (12/38) e 20,9% (18/86) dos caprinos e ovinos, respectivamente, foram positivos para *Salmonella* spp. na PCR; enquanto que nos animais do abatedouro, 60% (3/5) e 40% (2/5) dos caprinos e ovinos, respectivamente, apresentaram positividade para *Salmonella* spp. Os isolados de *Salmonella* spp. de caprinos e ovinos apresentaram maior resistência aos antimicrobianos oxitetracilina e oxacilina e 45% dos isolados apresentaram multirresistência a mais de três classes de antimicrobianos. Na caracterização filogenética dos isolados de *E.coli*, o grupo de maior frequência, tanto nos caprinos quanto nos ovinos, foi o grupo B1, seguido nos caprinos do grupo B2 e nos ovinos do grupo A. Os rebanhos de caprinos e ovinos avaliados no presente estudo são portadores de *Salmonella* spp. e de *E.coli* do grupo filogenético considerado virulento para os animais e para o homem, podendo contaminar o meio ambiente, outros animais e a carcaça na linha de abate.

Palavras-chave: antimicrobianos; caprino-ovinocultura; microbiologia; PCR

ABSTRACT

In northeastern Brazil, the goat and sheep industry is an important socio-economic activity, with emphasis on the family farm. This study aimed to determine the presence of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* in sheep and goats in the region of San Francisco through phenotypic and genotypic tests, and determine the sensitivity of isolates to antimicrobial agents. We collected samples of feces from 720 animals, 430 sheep and 190 goats, in 12 farms; and of 100 animals, 50 goats and 50 sheep, in slaughterhouse of Petrolina, PE. The isolation of *Salmonella* spp. was performed in Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) agar, Bismuth Agar and Hectoen agar, and of *Escherichia coli* in MacConkey agar. The phenotypic analyzes were performed through biochemical tests and the genotype by the polymerase chain reaction (PCR). We conducted antimicrobial susceptibility testing (MIC) in isolates of *Salmonella* spp. After the analysis of phenotypic tests, it was found that 83.3% (10/12) from properties in addition to the slaughterhouse, present suspected colonies for *Salmonella* spp. *E. coli* were isolated in all strains, confirmed by biochemical tests. In animals from the farms, 31.5% (12/38) and 20.9% (18/86) of goats and sheep, respectively, were positive for *Salmonella* spp. by PCR; whereas the animals in the slaughterhouse, 60% (3/5) and 40% (2/5) of goat and sheep, respectively, were positive for *Salmonella* spp. The isolates of *Salmonella* spp. of goats and sheep showed increased resistance to antimicrobials oxitetracilina and oxacillin and 45% of the isolates showed multidrug resistance to more than three classes of antimicrobials. In phylogenetic characterization of *E. coli* isolates, the group most often in both sheep and goats was the group B1, followed by group B2 and in sheep of group A. Herds of goats and sheep in the current study are carriers of *Salmonella* spp. and the *E. coli* of phylogenetic group considered virulent for animals and humans, and can contaminate the environment, other animals and carcasses on the slaughter line.

Keywords: antimicrobial; goat and sheep industry; microbiology; PCR

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Classificação de *Escherichia coli* nos grupos filogenéticos pela amplificação dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmentação do DNA TspE4.C2 p.29

Artigo

Figura 1: Produto da PCR de *Salmonella* spp. com amplificação de 274 pb em gel de agarose. M: Marcador de peso molecular de 100 pb. 1. Controle Positivo (ATCC 14023 *Salmonella thyphimurium*); 2 a 10: amostras de ovinos positivas p.42

Figura 2: Percentagem de isolados de caprinos e ovinos nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D p.44

LISTA DE QUADRO

Quadro 1: Sorotipos de *Samonella* spp de maior importância médica.....p.37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Técnicas de isolamento de *Salmonella* spp. em fezes de pequenos ruminantes p. 23

Artigo

Tabela 1. Coleta de amostras de fezes de caprinos e ovinos em propriedades e no abatedouro do município de Petrolina, estado de Pernambuco p. 36

Tabela 2: Relação dos iniciadores usados para detecção dos genes de caracterização filogenética de *E. coli* p. 40

Tabela 3: Condições da PCR dos genes de caracterização filogenética de *E.coli*..... p. 40

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de isolados de *Salmonella* spp. em caprinos frente aos antimicrobianos p. 45

Tabela 5: Concentrações bactericidas mínimas (CBM) de isolados de *Salmonella* spp. em caprinos frente aos antimicrobianos p. 45

Tabela 6: Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de isolados de *Salmonella* spp. em ovinos frente aos antimicrobianos p. 46

Tabela 7: Concentrações bactericidas mínimas (CBM) de isolados de *Salmonella* spp. em ovinos frente aos antimicrobianos p. 46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBM	Contagem Bactericida Mínima
CIM	Contagem Inibitória Mínima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
rpm	Rotação por minuto
TSA	Triptona Soja Ágar
UFC	Unidade Formadora de Colônia
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato

LISTA DE SÍMBOLOS

g	Gramma
h	Hora
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pmol	Picomol
U	Unidade
μg	Micrograma
μl	Microlitro

SUMÁRIO

	RESUMO	07
	ABSTRACT.....	08
	LISTA DE FIGURAS.....	09
	LISTA DE TABELAS.....	10
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	11
	LISTA DE SIMBOLOS.....	12
1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Produção de caprinos e ovinos no semiárido.....	17
2.2	Importância da sanidade caprina e ovina.....	18
2.3	<i>Salmonella</i> spp.....	18
2.4	Infecção por <i>Salmonella</i> spp. em caprinos e ovinos.....	19
2.5	Diagnóstico de <i>Salmonella</i> spp. nas fezes de pequenos ruminantes.....	22
2.6	Resistência de <i>Salmonella</i> spp. aos antimicrobianos.....	24
2.7	<i>Escherichia coli</i>	25
2.8	Colibacilose em caprinos e ovinos.....	27
2.9	Diagnóstico de <i>Escherichia coli</i> nas fezes de pequenos ruminantes.....	28
2.10	PCR para caracterização de <i>Escherichia coli</i> em diferentes grupos filogenéticos.....	29
3	Artigo Científico	
	Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> em caprinos e ovinos clinicamente saudáveis na região do submédio São Francisco.....	31
	RESUMO.....	31
	ABSTRACT	32
1	INTRODUÇÃO	33
2	MATERIAL E MÉTODO	34
2.1	Coleta e preparação das amostras.....	34
2.2	Isolamento de <i>Salmonella</i> spp	35

2.3	Caracterização fenotípica de <i>Salmonella</i> spp.....	36
2.4	Caracterização genotípica através da reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	36
2.4.1	Extração de DNA	36
2.4.2	Reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	36
2.5	Soroaglutinação para identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	37
2.6	Teste de sensibilidade de isolados de <i>Salmonella</i> spp. aos antimicrobianos.....	38
2.7	Isolamento de <i>Escherichia coli</i>	38
2.8	Caracterização fenotípica de isolados de <i>E.coli</i>	39
2.9	Caracterização filogenética de isolados de <i>E.coli</i>	39
3	RESULTADOS	41
3.1	Caracterização fenotípica de isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	41
3.2	PCR para identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	41
3.3	Soroaglutinação de isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	42
3.4	Teste de sensibilidade de isolados de <i>Salmonella</i> spp.aos antimicrobianos.....	42
3.5	Caracterização Fenotípica de isolados de <i>E.coli</i>	44
3.6	PCR de caracterização filogenética de <i>E.coli</i>	44
4	DISCUSSÃO	46
5	CONCLUSÕES.....	50
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
	ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro é destaque durante séculos como área propensa para a exploração de ruminantes domésticos, notadamente caprinos e ovinos, pelo potencial da vegetação natural para a manutenção e sobrevivência dos animais destas espécies. A caprino-ovinocultura apresenta especial importância social e econômica para os ecossistemas do semiárido brasileiro, dadas às poucas alternativas econômicas para a região (LIMA; BAIARDI, 2007). Porém as altas taxas de morbidade e mortalidade presentes em propriedades no Nordeste ocasionam sérios prejuízos econômicos aos produtores, chegando a inviabilizar a atividade pecuária (VIEIRA et al., 1998).

De maneira geral, esses animais são explorados tradicionalmente em sistema de criação extensivo com reduzida adoção de tecnologias, o que tem sido responsabilizado pelos baixos índices zootécnicos, traduzidos pela reduzida velocidade de crescimento dos animais, abate tardio, baixo rendimento e carcaça que não satisfaz as exigências do mercado em termos de qualidade, além de idade avançada ao primeiro parto, longos intervalos entre partos, baixa produção leiteira na vida útil das matrizes e alta taxa de mortalidade nos rebanhos (EMPARN, 2006).

A produção e a produtividade desses animais podem ser influenciadas por uma série de fatores, destacando-se aqueles de origem nutricional, reprodutivo e sanitária. No que se refere aos problemas de ordem sanitária, destacam-se as doenças de origem infecciosa e parasitária, sendo responsáveis por inúmeras perdas econômicas, devido à baixa na produção de carne e/ou leite, além das altas taxas de mortalidade (VIEIRA et al., 1998). Doenças infecciosas e parasitárias constituem um sério entrave ao desenvolvimento da criação de caprinos e ovinos, por representarem parcela considerável das perdas em animais, com grande repercussão econômica. Nesse contexto, surgem as enfermidades causadas por bactérias, que representam uma ameaça ao desenvolvimento da caprino-ovinocultura brasileira (EMPARN, 2006).

As bactérias do gênero *Salmonella* e *Escherichia coli* têm como habitat normal o trato intestinal dos seres humanos e de muitos animais e, em condições sanitárias precárias, elas podem contaminar o meio ambiente. Estes micro-organismos estão entre os principais agentes causadores de doenças de origem

alimentar no mundo todo (LEWIS, 1997). *Salmonella* spp. é frequentemente isolada de animais sadios (VANSELOW et al., 2007), entretanto, as informações sobre salmonelose em caprinos e ovinos são muito limitadas (OIKONOMOU et al., 2008).

O presente trabalho objetivou determinar a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos clinicamente saudáveis na região do submédio São Francisco, estado de Pernambuco com o auxílio de técnicas tradicionais e moleculares, além de determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de caprinos e ovinos no semiárido brasileiro

Na região nordeste do Brasil, a caprino-ovinocultura é uma importante atividade sócio-econômica, com destaque para a agricultura familiar. Atualmente, a atividade se expande com investimentos de empresários e incentivos governamentais, dotando o criatório com soluções alternativas baseadas em tecnologias regionais (QUADROS, 2005).

No Brasil, o efetivo dos rebanhos de caprinos é de 9.312.784 de cabeças e 17.380.581 de cabeças de ovinos, sendo que a região Nordeste detêm um rebanho de caprinos e ovinos de 8.458.578 de cabeças e 8.057.754 de cabeças, respectivamente, com destaque para o estado da Bahia, com o maior rebanho de caprinos do Brasil, com 3.020.849 cabeças (30,6%) e o segundo rebanho de ovinos, com 3.125.766 de cabeças (18%), atrás do Rio Grande do Sul. O estado de Pernambuco ocupa a segunda posição em número de rebanhos de caprinos e a quarto em rebanho de ovinos, com 1.720.128 de cabeças (18,6%) e 1.622.511 de cabeças (9,3%), respectivamente (IBGE, 2010).

No semiárido, o sistema predominante de produção de ovinos e caprinos para corte é o extensivo, dependente da vegetação de caatinga e caracterizado pela utilização de animais com genótipos não especializados. Este sistema está quase sempre associado a cultivos de subsistência, com índices de desempenho baixos associados à alta mortalidade de animais e a idade tardia para atingir o peso de abate (GUIMARÃES FILHO; MOREIRA, 2011).

No Brasil, ainda são comuns os sistemas de produção voltados para subsistência, onde os animais são a principal fonte de proteína, principalmente para aquelas populações localizadas em regiões áridas, já que os caprinos têm elevada adaptabilidade às condições edafo-climáticas da referida região. Por outro lado, a caprino-ovinocultura vem se modernizando, podendo-se observar criatórios comerciais bem organizados, com grandes estruturas de produção e na maioria das vezes, com agregação de valor, através do beneficiamento e comercialização dos produtos (RIBEIRO, 1997).

2.2 Importância da sanidade caprina e ovina

As doenças bacterianas estão associadas tanto a queda na produção como diminuição no bem estar dos animais (QUINN et al., 2005). Em um estudo realizado por PINHEIRO et al. (1999) em rebanhos caprinos no Ceará, foi demonstrada alta taxa de mortalidade principalmente entre animais jovens (22,8%), comprometendo o desenvolvimento da atividade em função do manejo sanitário inadequado. Os autores ressaltam ainda que não há maiores preocupações com a higiene e qualidade do leite mesmo em alguns rebanhos tecnificados.

Presença de diarreia foi relatada por 87,8% dos criadores, no sertão pernambucano, segundo Alencar et al. (2010), sendo este um dos sinais clínicos da colibacilose e salmonelose, enfermidades ocasionadas pela *E. coli* e *Salmonella* spp. , respectivamente. Os autores ainda discutem que os caprino-ovicultores do sertão de Pernambuco, em sua maioria, possuem instalações inadequadas para abrigar seus animais, têm baixo nível de adoção de tecnologias ou as utilizam de forma inadequada, havendo dificuldade na prevenção e controle de doenças.

2.3 *Salmonella* spp.

As bactérias *Salmonella* são bastonetes gram-negativos, anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos. Geralmente são móveis por flagelos peritríquios. Possuem temperatura ótima para crescimento de 37°C. Catalisam D-glucose e outros carboidratos com produção de ácidos e, geralmente, de gás. São oxidase negativa, catalase positiva, indol e Voges-Proskauer negativos e vermelho metil e citrato Simmons positivos. Descarboxilam os aminoácidos lisina e ornitina. São produtoras de H₂S; não hidrolisam uréia e reduzem nitrato (HOLT et al., 1994).

Seu habitat natural é o trato intestinal dos seres humanos e de animais de sangue quente. Em condições sanitárias precárias, elas podem contaminar alimentos (TORTORA et al., 2005). É considerada patogênica para o homem e para muitas espécies de animais. Agente causador da febre tifóide, febre entérica, gastroenteritis e septicemia (HOLT et al., 1994). A salmonelose frequentemente localiza-se nas mucosas do íleo, no ceco e no cólon, bem como nos linfonodos

mesentéricos de animais infectados, podendo ser eliminadas pelas fezes contaminando o ambiente e o rebanho (QUINN et al., 2005).

A classificação moderna baseada no estudo do DNA considera somente três espécies: *Salmonella entérica*, *Salmonella bongorie*, *Salmonella subterrânea*. (SHELOBOLINA et al., 2004). A espécie entérica possui seis subespécies (*Entérica*, *Salamae*, *Arizonae*, *Diarizonae*, *Houtenae* e *Indica*). A subespécie Entérica possui um grande número de sorovares (*Paratyphi A*, *Typhimurium*, *Agona*, *Derby*, *Heidelberg*, *ParaTyphi B*, *Cholerasuis*, *Infantis*, *Virchow*, *Dublin*, *Enteritidis*, *TyphieA natum*). O nome dos diferentes sorovares tem origem tanto no nome da doença ou do lugar onde foram inicialmente isoladas como: *S. Cholerasuis* ou *S. Dublin* (GOMES, 2012).

Salmonelas podem causar um amplo espectro de doenças em humanos variando de febre tifóide, septicemia, gastroenterite e infecções focais. É uma das principais causas de gastroenterite veiculada por alimentos em todo o mundo, e um importante problema de saúde pública, tanto em países industrializados como em países em desenvolvimento (PAYMENTE & RILEY, 2002). As salmonelas podem sobreviver a temperaturas de cozimento relativamente baixas em centro de ovos, carnes recheadas ou mal passadas. A falta de boas práticas na manipulação de alimentos contribui para a disseminação dessas bactérias no ambiente de preparo de alimentos, tendo elas a capacidade de aderir superfícies como teflon, aço, vidro e fôrmica, formando biofilme (AUSTIN, 1998).

Segundo Mondal et al. (2008) embora com mesmo aspecto colonial, o perfil genético dos isolados de *Salmonella* spp. tende a ser específico ao seu hospedeiro.

2.4 Infecção por *Salmonella* spp. em caprinos e ovinos

Pesquisas indicam que os ovinos e caprinos abrigam uma larga escala de sorovares de *Salmonella* e atuam como uma das fontes de infecção em humanos (VANSELOW et al., 2007; MILNES et al., 2008). No estudo conduzido por Bonke et al. (2012) na Alemanha *S. Diarizonae* foi mais comum em animais adultos, do que nos jovens e em ovinos do que em caprinos. Os mesmos achados foram descritos por Sandberg et al. (2002) em relação a faixa etária dos animais. Na Etiópia, em

animais abatidos, a maior freqüência de *Salmonella* spp. foi descrita em caprinos (WOLDEMARIAM et al., 2005).

Salmonella spp. é frequentemente isolada de animais sadios (VANSELOW et al., 2007), sendo que as informações a cerca da salmonelose em caprinos e ovinos são muito limitadas. A eliminação da bactéria pelos animais é maior em períodos de calor (BRANHAM, et al., 2005). Além disto, o parto é um importante fator para susceptibilidade dos ovinos a infecção por *Salmonella* spp., o que eleva a eliminação desta bactéria nas fezes dos animais (MILNES et al., 2008). Segundo Duffy et al. (2009) as condições de criação e transporte dos caprinos podem ser fundamentais para indicar a presença de *Salmonella* spp. nas fezes, sendo esta a principal via de contaminação das carcaças nos abatedouros. Ovinos são excretores assintomáticos de *Salmonella* spp. nas suas fezes (MILNES et al. 2008). As matrizes são consideradas os principais vetores para disseminação da *Salmonella* spp. entre as propriedades (SANDBERG et al., 2002).

Os caprinos e ovinos podem apresentar a forma da doença subclínica ou latente, sendo, portanto, apenas portadores de salmonelas (WOLDEMARIAN et al., 2005; MILNES et al., 2008; BONKE et al., 2012), mas fatores como estresse, infecções intercorrentes, transporte, superlotação, prenhez, temperatura ambiental extrema, privação de água, além do número de salmonelas ingeridas, a virulência do sorotipo e a suscetibilidade do hospedeiro, podem ativar a doença para a forma clínica (QUINN et al., 2005). Segundo Sandberg et al. (2002) não existe um padrão de sinais clínicos característicos em rebanhos infectados por *Salmonella* spp. Os ruminantes são portadores menos frequentes de *Salmonella* spp. quando comparado aos suínos (DAVIES et al., 2004).

Estudos conduzidos na Etiópia têm indicado a presença de salmonelose em vários alimentos destinados à animais (ALEMAYEHU et al., 2003; MOLLA et al., 2004) e humanos (MACHE et al., 1997). Ausência de moscas na propriedade, fonte dos alimentos ofertados aos animais e condições de higiene são muito importantes, especialmente nas dez semanas anteriores ao abate de caprinos e ovinos (VANSELOW et al., 2007).

Em ovinos, o sorotipo *Salmonella Dublin* provoca enterocolite e septicemia e o sorotipo *Salmonella Brandenburg* provoca aborto (QUINN et al., 2005). Os

sorovares de *Salmonella* mais comuns associados com ovinos no período de 1991-1997 foram *S. Typhimurium*, *S. Arizonae* (O61:H:1,2,7), *S. Derby* e *S. Montevideo*. O último destes tem regularmente sido associado com o aborto em ovelhas, em especial na Escócia, sudeste e norte da Inglaterra (WRAY & WRAY, 2000). Durante o período de 1970-1981, um total de 67 incidentes de *S. Montevideo* foram identificados, mas em 1982 um aumento repentino ocorreu e a infecção foi confirmada em 38 rebanhos. *S. Typhimurium* parece ser o sorotipo de *Salmonella* mais comum em ovinos, embora o fagotipo predominante pode diferir entre países. *S. Abortus ovis* foi descrito em muitos países no mundo e em alguns, é um problema sério. *S. Indiana* foi descrito em surto de aborto em ovelhas (LUQUE et al., 2009). As endotoxinas produzidas por *Salmonella* spp., em particular a *S. Abortus ovis* podem induzir morte embrionária, aborto e parto prematuro (SCHLAFER et al., 1994). Segundo Lantier et al. (2012) a resistência dos ovinos à infecção por *S. Abortus ovis* está associada a diversos genes que podem ser utilizados como marcadores em programas de seleção genética. *Salmonella* Diarizonae foi descrita como etiologia de orquite supurativa em ovinos na Espanha (FERRERAS et al., 2007). Segundo os mesmos autores a possibilidade da existência de portadores nos rebanhos não pode ser descartada dada a prevalência de *Salmonella* spp. em ovinos saudáveis.

S. arizonae foi isolado pela primeira vez de ovelha nos EUA e posteriormente, isolado no Reino Unido, Canadá, Noruega e Alemanha. Muitos outros sorovares de *Salmonella* foram isolados de ovinos em todo o mundo. Mesmo a prevalência de salmonelose em ovinos sendo baixa, mas quando ocorrem surtos, as perdas podem ter graves conseqüências econômicas (WRAY & WRAY, 2000). Surto de diarreia ocasionado por *S. arizonae* em cabritos foi descrito na Espanha e apresentou morbidade de 90% e mortalidade de 40% (MUÑOZ et al., 1996). Uma causa importante da diarreia é o manejo sanitário deficiente, que pode provocar um aumento de coliformes fecais, acrescentando a presença de *Salmonella*, entre outros patógenos do trato entérico (RIBEIRO, 1997).

2.5 Diagnóstico de *Salmonella* spp. nas fezes de pequenos ruminantes

A obtenção de fezes diretamente, sem o uso de swab, é a forma mais eficaz de coleta de material a fim de aumentar a sensibilidade no isolamento de *Salmonella* spp. nos pequenos ruminantes (SANDBERG et al., 2002). Os mesmos autores indicaram que o caldo selenito cistina pode apresentar maior sensibilidade do que o caldo rappaport-vasiladis comumente utilizado no diagnóstico de *Salmonella* spp. A quantidade de fezes utilizada para o cultivo de *Salmonella* spp. também se mostra muito importante para garantir a sensibilidade no isolamento deste patógeno (BONKE et al., 2012).

Várias estratégias são utilizadas para o cultivo de *Salmonella* spp. nos pequenos ruminantes (Tabela 1). O isolamento e identificação bioquímica de *Salmonella* spp. é muitas vezes complicada, sendo que alguns sorotipos podem ser inibidos pelos meios clássicos de enriquecimento (HABRUN et al., 2006). Isto ressalta a importância da combinação das técnicas tradicionais com outras metodologias como ELISA e PCR para o diagnóstico da infecção por *Salmonella* spp. em pequenos ruminantes (PAO et al., 2005).

Tabela 1: Técnicas de isolamento de *Salmonella* spp. em fezes de pequenos ruminantes

Origem	Pré-enriquecimento	Enriquecimento	Plaqueamento	Técnica complementar	Referência
Fazenda	Água peptonada Tamponada	Caldo Rappaport-Vassiliatis	Ágar Verde Brilhante	Bioquímica Sorologia;	HJARTARDÓTTIR et al., 2002
	-	Caldo Selenito Cistina	Ágar Verde Brilhante	Soroaglutinação	SANDBERG et al., 2002
	-	-	-	Extração do DNA Fecal; PCR; Real Time PCR;	FURET et al., 2009
	Água Peptonada Tamponada	Rappaport-Vassiliatis	Ágar Xilose Lisina; XLT4	Bioquímica; Teste de Aglutinação;	PAO et al., 2005
	Água Peptonada Tamponada	Diassalm	Ágar Rambach	Sorologia; Biologia molecular	DAVIES et al., 2004
	Água Peptonada Tamponada	Caldo Rappaport-Vassiliatis; Caldo Selenito Cistina	Ágar Verde Brilhante; Ágar Redlactose Sacarose; ÁgarXLD.	Bioquímica; Sorotipagem; Fagotipagem;	WOLDEMARIAMA et al., 2005
Abatedouro	Água Peptonada Tamponada	Diassalm agar plates	Ágar Rambach	Bioquímica; Sorotipagem;	MILNES et al., 2008
	Água Peptonada Tamponada	Caldo Rappaport-Vassiliatis e MKTTn	Ágar XLD e ágar cromogênico	Sorotipagem e fagotipagem	MOLLA et al., 2006
	Água Peptonada Tamponada	Caldos Rappaport-Vassiliatis e Tetrionato	Ágar XLD; Ágar <i>Salmonella-Shigella</i>	Bioquímica;	TEKLU & NEGUSSIE, 2011
	Água Peptonada Tamponada	Caldos manitol selenito cistina e Rappaport-Vassiliadis	Ágar Bismuto Sulfito e XLD	Sorotipagem, Fagotipagem, Bioquímica.	DUFFY et al., 2009

A reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é uma estratégia útil para detecção de *Salmonella* spp. em carnes, fezes, tecidos, sangue e leite, com diferentes metodologias de manipulação das amostras para inativar possíveis inibidores da reação, como sais biliares, hemoglobina e componentes sangüíneos (AABO et al., 1993; COHEN et al., 1994; FADL et al., 1995).

A PCR consiste na síntese *in vitro* de cópias de DNA a partir de uma seqüência alvo. A especificidade do teste é obtida a partir da obtenção de seqüências complementares ao DNA do agente pesquisado. Em um ensaio de PCR, caso haja complementaridade entre os iniciadores e o DNA da amostra analisada, haverá ligação de ambos seguida pela reação de síntese de DNA *in vitro*. A repetição desta reação por diversos ciclos (30-40) dará origem a bilhões de cópias alvo em um processo de amplificação conferindo extraordinária sensibilidade. A PCR pode ser aplicada não somente na detecção direta do agente em amostras clínicas, mas tem sido de grande auxílio na identificação do gênero *Salmonella* em isolados e é empregada em vários métodos de genotipagem ou caracterização molecular.

2.6 Resistência de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos

O uso indiscriminado das drogas antimicrobianas na produção animal é comum, contudo traz importantes impactos ao meio ambiente e à saúde humana (GOULD et al., 2010). A resistência tem se agravado principalmente nos países em desenvolvimento onde as condições de higiene são precárias e existe um mercado de drogas antimicrobianas falsificadas. A multiresistência de *Salmonella* spp aos antimicrobianos é um assunto de grande interesse a comunidade científica, visto seu potencial de transmissão aos seres humanos pelos alimentos (MOLLA et al., 2007).

Nos caprinos e ovinos a resistência da *Salmonella* spp. às drogas antimicrobianas tem sido estudada (MOLLA et al., 2006; GOUSIA et al., 2011; BONKE et al., 2012). Isolados multirresistentes de *Salmonella Typhimurium* fagotipo 193 foi descrita por Molla et al. (2006) na Etiópia. Por outro lado, em um estudo realizado na Alemanha por Bonke et al. (2012) os isolados de *S. Diarizonae* foram sensíveis às drogas antimicrobinas testadas. Os mesmos achados foram descritos

por Luque et al. (2009) ao avaliar a sensibilidade de *S. Indiana* isoladas de casos de aborto em ovelhas.

A resistência aos antimicrobianos dentro da Família *Enterobacteriaceae* é associada a elementos genéticos móveis, em particular aos plasmídeos e integrons (POTRON et al., 2011). Nos pequenos ruminantes a multirresistência em *Salmonella* spp. foi associada a integrons da classe 1, o que também ocorre no homem e demais espécies animais (MOLLA et al., 2007).

2.7 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* pertence a família *Enterobacteriaceae*, são anaeróbia facultativa, bastonete Gram-negativo, fermentador de glicose, lactose, sacarose, sorbitol e dulcitol e reduz nitrato a nitrito, é oxidase-negativa, catalase-positivo, possui atividade de descarboxilase e produz indol a partir da desaminação de triptofano (HOLT et al., 1994), portanto é fundamental o emprego de testes bioquímicos para as corretas identificações e diferenciações entre os gêneros pertencentes à família *Enterobacteriaceae*. A utilização das provas bioquímicas denominadas IMVIC classifica a *E. coli* típica como Indol positivo, Vermelho de Metila positivo, Voges-Proskauer negativo e Citrato negativo (QUINN et al., 1994).

São classificadas em seis categorias de acordo com sua patogenicidade: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteroinvasora (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (KUHNERT et al., 2000). De todas as categorias, a única considerada como zoonose é a EHEC (GRIFFIN; TAUXE, 1991).

As *E. coli* EHEC são produtoras de toxinas “Shiga-like” (Stx), fator de virulência que contribui para a patogenicidade da EHEC, dando habilidade ao patógeno em causar lesões nas microvilosidades da parede intestinal do hospedeiro (KUHNERT et al., 2000). Podem causar desde uma diarreia branda, sanguinolenta (colite hemorrágica) até síndrome hemolítica urêmica (SHU) em crianças e adultos, com maiores ou menores efeitos conforme as condições imunológicas do indivíduo

(BETTELHEIM et al., 2005). A SHU provoca a maior complicação das infecções, caracterizada por anemia hemolítica, trombocitopenia e falência renal aguda, que pode estender-se a outros órgãos (CRAY J.R., et al, 1996).

São conhecidas duas categorias de *E. coli* EPEC denominadas típica e atípica, tendo como principal diferença a presença do plasmídeo EAF somente nas EPEC típicas. As duas categorias não produzem toxina Stx e são capazes de causar uma lesão histopatológica no epitélio do intestino chamada lesão “*attaching and effacing*”. Depois que aderem à barreira gástrica, as EPEC aderem à mucosa do intestino delgado e grosso, levando ao quadro de diarreia (TRABULSI, 2005).

Associada à diarreia, em indivíduos de todas as idades as enterotoxinas de *E. coli* ETEC são classificadas como termoestáveis (ST) e termo lábeis (LT) (QUINN et al, 1994). As enterotoxinas LT são subdivididas em LT-I (*E. coli* patogênicas associadas a animais e ao homem) e LT-II (*E. coli* associadas a animais e alimentos, mas raramente ao homem). As ETEC aderem às células da mucosa do intestino delgado e produzem uma enterotoxina termo-estável (EAST1), sem provocar alteração nas microvilosidades e nem penetram seu epitélio. As enterotoxinas LT estimulam enzimas envolvidas na manutenção do equilíbrio hidrossalino da mucosa intestinal, causam acúmulo de água e eletrólitos no lúmen intestinal, posteriormente desencadeiam uma diarreia em que as fezes não apresentam leucócitos, sangue ou muco (NATARO; KAPER, 1998). As enterotoxinas ST são pouco imunogênicas sendo subdivididas em STa (resultam em uma secreção de água e eletrólitos) e STb (estimula a liberação de carbonatos das células intestinais) (NATARO; KAPER, 1998).

As cepas EIEC correspondem a sorotipos bem definidos, caracterizados por seus antígenos O, ausência quase constante de antígeno flagelar, incapacidade de descarboxilar a lisina e presença quase constante de um plasmídeo que transporta os determinantes genéticos responsáveis pela penetração de EIEC na célula epitelial. Os sorotipos de EIEC são estreitamente relacionados a *Shigella*, apresentando em comum muitas características bioquímicas, antigênicas e de patogenicidade. A infecção intestinal é resultado da penetração da bactéria nas células intestinais sem a produção de nenhum tipo de toxina, há necrose neste

tecido, podendo causar diarreia sanguinolenta ou não, acompanhada de dores abdominais e febre (TRABULSI, 2005).

As cepas EAEC formam um padrão agregativo de adesão, quando se associam com células Hep-2 (células de carcinoma epidermóide de laringe humana) (NATARO et al., 1992). É um plasmídeo que expressa uma adesina (AAF/1) e produz uma enterotoxina termo-estável (EAST1), mas não causam o fenômeno “*attaching-and-effacing*” (A/E) como ocorre em EPEC (NATARO et al., 1992). Causam lesões que se caracterizam por hiperplasia moderada do íleo e do ceco, edema das vilosidades do intestino delgado e deposição de camadas de bactérias agregadas, empilhadas sobre o epitélio (TRABULSI, 2005).

As *E. coli* DAEC são caracterizadas pelo padrão difusamente aderente no ensaio de aderência em células HEP-2, e causa uma síndrome de diarreia aquosa em adultos e crianças. A maioria das cepas de DAEC expressa uma fímbria de superfície designada F 1845 que pode ser codificada tanto por cromossomo como por plasmídeo (SOUSA, 2006). Uma linhagem específica de DAEC (Afa/Dradhesins DAEC) está envolvida com infecções de trato urinário (pielonefrite, cistites e bacteriúria assintomática) (SERVIN, 2005).

2.8 Colibacilose em caprinos e ovinos

As cepas patogênicas de *E. coli* acometem de forma sistêmica cordeiros de 2 a 6 semanas de vida resultando em morte rápida. Outras manifestações como artrite e meningite podem ocorrer. A forma entérica se manifesta por diarreia clara em cordeiros de até três dias de vida. É uma enfermidade oportunista, acomete animais criados em sistema intensivo, ocorrendo, principalmente, por meio das vias de entrada oral e umbilical (ALVES, 2006).

A associação da *E. coli* EPEC com o Rotavírus são comuns e causa doença grave e fatal aos recém-nascidos, na primeira semana de vida. Pode haver anemia hemolítica microangiopática, devido a enterotoxinas e eventualmente, devido a um fator de invasividade, pode ocorrer septicemia, pneumonia e meningite. A colibacilose septicêmica, pode causar morte súbita, sem sintomas aparentes. A grande perda de líquidos ocorre devido às enterotoxinas estimularem a atividade da

adenilciclase, nas células epiteliais, aumentando a permeabilidade do epitélio intestinal. Os casos agudos da doença apresentam colapso e, ocasionalmente, meningite, que se manifesta por andar atado e convulsões tetânicas. Os casos crônicos, geralmente, se manifestam por artrite (QUINN et al. 2005.).

Os reservatórios da bactéria são os próprios animais, através de suas fezes contendo *E. coli* EPEC. Em fezes, ao abrigo do sol, pode manter-se viva por várias semanas, bem como na água e alimentos contaminados por fezes (SANTOS, 2004).

De acordo com a forma de infecção, diferentes tipos de cepas podem estar relacionadas (QUINN et al ., 1994). Na região Nordeste, devido aos sistemas de produção de caprinos e ovinos, caracterizado por apresentarem baixos índices produtivos em decorrência, principalmente, de práticas de manejo inadequado, más condições sanitárias, baixa capacidade de investimento, irregularidades na disponibilidade de alimentos ao longo do ano, baixa capacidade de absorção tecnológica pelas propriedades, entre outras (PINHEIRO et al.,1999), causa alta prevalência de colibacilose nos rebanhos (SANTOS, 2001).

2.9 Diagnóstico de *Escherichia coli* nas fezes de pequenos ruminantes

Amostras semeadas diretamente sobre a superfície de ágar MacConkey em placas de Petri são incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. O efeito seletivo do meio é exercido pelos sais biliares e pelo cristal violeta presentes no meio, que atuam inibindo a flora Gram positiva. A fermentação da lactose é observada pela alteração da cor do indicador de pH vermelho neutro. De maneira aleatória, colônias isoladas, fermentadoras de lactose com morfologia característica são selecionadas desta cultura preliminar, para a detecção de *E. coli* para posteriores testes bioquímicos (HOLT et al., 1994).

E. coli é identificada por diferentes características bioquímicas, como ausência da enzima citocromo oxidase, produção de indol, redução de nitratos, fermentação da glicose e outros carboidratos, produção de gás. A maioria dos isolados não produz ácido sulfídrico (H₂S) (QUINN et al., 1994).

2.10 PCR para caracterização de *Escherichia coli* em diferentes grupos filogenéticos

A classificação filogenética das linhagens de *E. coli* pode ser realizada, segundo Clermont, et al. (2000) em PCR-Multiplex, caracterizando os isolados de *E. coli* em grupos filogenéticos baseando-se na presença ou ausência de dois genes (*chuA* e *yjaA*) e um fragmento de DNA anônimo (*TspE4.C2*). Entretanto, alguns isolados podem não ser claramente classificados por não pertencerem a um dos quatro grupos filogenéticos principais de *E. coli*.

O esquema proposto permitiu a classificação das cepas nos grupos filogenéticos A, B1, B2, D. As cepas virulentas geralmente classificam-se no grupo B2, porém algumas podem ser classificadas no grupo D. Por outro lado, os isolados comensais pertencem aos grupos A e B1 (CLERMONT et al., 2000; SABATÉ et al., 2006) (Figura 1). Análises filogenéticas têm sido frequentemente realizadas em bactérias, especialmente em *E. coli* isoladas de amostras humanas (JOHNSON et al., 2005). No entanto, em medicina veterinária esses estudos vêm sendo cada vez mais realizados.

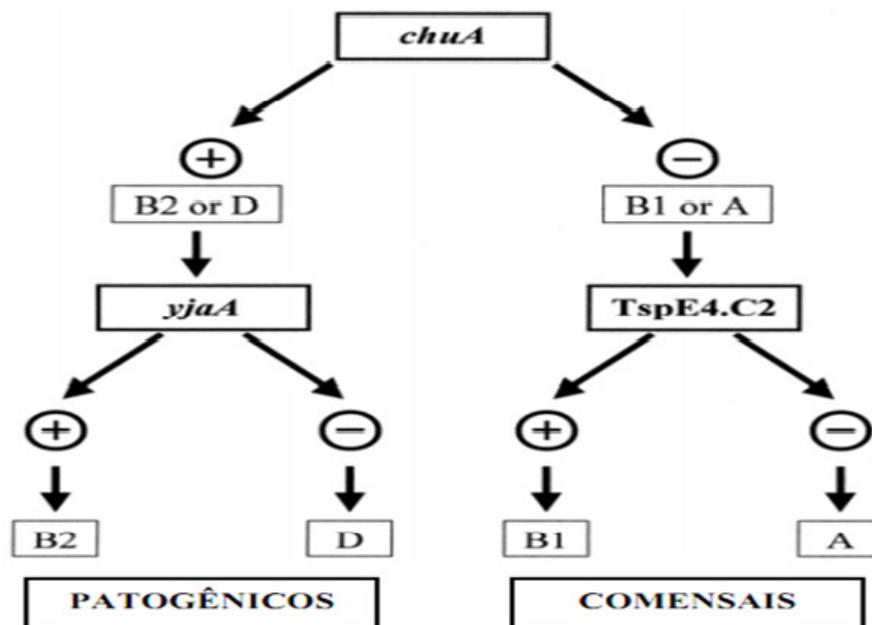


Figura 1: Classificação de *E. coli* nos grupos filogenéticos pela amplificação dos genes *chuA* e *yjaA* e fragmentação do DNA *TspE4.C2*.

Fonte: CLERMONT et al., 2000.

Os filogrupos diferem muito desde características bioquímicas, curva de crescimento até o padrão de resistência aos antimicrobianos (GORDON & COWLING, 2003). Segundo Gordon & Cowling (2003) a classificação de *E. coli* dentro dos filogrupos pode estar associada a origem geográfica das amostras. Contudo pesquisas recentes têm indicado que a evolução destes grupos acompanhou a especiação de seus hospedeiros (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2006; CLEMONT et al., 2011). Carlos et al. (2010) encontraram relação entre os grupos filogenéticos de *E. coli* nos ruminantes, sendo que esta pode estar associada a particularidade do seu sistema digestório. Nestes animais o grupo filogenético predominante foi o B1. O grupo B1 não pode ser utilizado como um indicador de contaminação por fezes de ruminantes, uma vez que é o que apresenta maior resistência e distribuição ambiental (WALK et al., 2007). A distribuição dos filogrupos pode estar associada ao patotipo de *E. coli*, sendo que as EPEC são menos relacionadas a um hospedeiro específico, de modo diferente das STEC, comuns em ruminantes (ISHII et al., 2007). Os autores relatam uma prevalência de 92% de STEC dentro do grupo filogenético B1.

3 Artigo Científico

Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos clinicamente saudáveis na região do submédio São Francisco

RESUMO

O presente trabalho objetivou determinar a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos na região do submédio São Francisco, através de testes fenotípicos e genotípicos, além de determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos. Foram coletadas amostras de fezes de 720 animais, sendo 430 ovinos e 190 caprinos, em 12 propriedades do município de Petrolina e 100 animais no Abatedouro Municipal de Petrolina, PE. As análises fenotípicas foram realizadas através de testes bioquímicos e as genotípicas através da reação pela cadeia da polimerase (PCR). Realizou-se teste de sensibilidade aos antimicrobianos (CIM) nos isolados de *Salmonella* spp. Após a análise dos testes fenotípicos, verificou-se que 83,3% (10/12) das propriedades, além do abatedouro, apresentaram colônias suspeitas para *Salmonella* spp. Em todas as amostras foram isoladas *E.coli*, confirmadas por testes bioquímicos. Nos animais provenientes das propriedades, 31,5% (12/38) e 20,9% (18/86) dos pools de caprinos e ovinos, respectivamente, foram positivos para *Salmonella* spp. na PCR; enquanto que nos animais do abatedouro, 60% (3/5) e 40% (2/5) dos pools dos caprinos e ovinos, respectivamente, apresentaram positividade para *Salmonella* spp. Na caracterização filogenética dos isolados de *E.coli*, o grupo de maior frequência, tanto nos caprinos quanto nos ovinos, foi o grupo B1, seguido nos caprinos do grupo B2 e nos ovinos do grupo A. Os isolados de *Salmonella* spp. de caprinos e ovinos apresentaram maior resistência aos antimicrobianos oxitetracilina e oxacilina e 45% dos isolados apresentaram multirresistência a mais de três classes de antimicrobianos. Os rebanhos de caprinos e ovinos avaliados no presente estudo são portadores de *Salmonella* spp. e de *E.coli* do grupo filogenético considerado virulento para os animais e para o homem, podendo contaminar o meio ambiente, outros animais e a carcaça na linha de abate.

Palavras-chave: caprino; ovino; *Salmonella*; *Escherichia coli*; PCR.

ABSTRACT

In northeastern Brazil, the goat and sheep industry is an important socio-economic activity, with emphasis on the family farm. This study aimed to determine the presence of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* in sheep and goats in the region of San Francisco through phenotypic and genotypic tests, and determine the sensitivity of isolates to antimicrobial agents. We collected samples of feces from 720 animals, 430 sheep and 190 goats, in 12 farms; and 100 animals, in slaughterhouse of Petrolina, PE. The isolation of *Salmonella* spp. was performed in XLD, Agar Agar and Bismuth Hectoen and of *Escherichia coli* in MacConkey agar. The phenotypic analyzes were performed through biochemical tests and the genotype by the polymerase chain reaction (PCR). We conducted antimicrobial susceptibility testing (MIC) in isolates of *Salmonella* spp. After the analysis of phenotypic tests, it was found that 83.3% (10/12) from properties in addition to the slaughterhouse, suspected colonies were *Salmonella* spp. *E. coli* were isolated in all strains, confirmed by biochemical tests. In animals from the farms, 31.5% (12/38) and 20.9% (18/86) of goats and sheep, respectively, were positive for *Salmonella* spp. by PCR; whereas the animals in the slaughterhouse, 60% (3/5) and 40% (2/5) of goat and sheep, respectively, were positive for *Salmonella* spp. In phylogenetic characterization of isolates of *E. coli*, the group most often in both sheep and goats was the group B1, followed by group B2 and in sheep of group A. The isolates of *Salmonella* spp. of goats and sheep showed increased resistance to antimicrobials oxitetracilina and oxacillin and 45% of the isolates showed multidrug resistance to more than three classes of antimicrobials. Herds of goats and sheep in the current study are carriers of *Salmonella* spp. and the *E. coli* of phylogenetic group considered virulent for animals and humans, and can contaminate the environment, other animals and carcasses on the slaughter line.

Keywords: goat; sheep; *Salmonella*; *Escherichia coli*; PCR

1 INTRODUÇÃO

O controle da saúde dos animais, além de garantir uma produção compatível com suas características zootécnicas, propicia uma fonte de alimento confiável. Ou seja, na agricultura familiar, cada animal doente, além de representar prejuízo econômico pela queda na produtividade, também significa risco para a saúde dos demais animais, e de humanos, em se tratando de zoonoses (AGUIAR, 2007).

Sorotipos de *Salmonella* ocorrem em todo mundo e provocam infecções em vários animais, especialmente mamíferos, aves e répteis, sendo excretados principalmente através das fezes, contaminando o meio ambiente. O ambiente e as instalações podem tornar-se persistentemente contaminados com *Salmonella* após a introdução desta bactéria no rebanho, contribuindo para a propagação e manutenção deste agente por longos períodos de tempo (QUINN et al, 2005). É importante ressaltar que em lotes que chegam positivos no abatedouro frigorífico é a propriedade que ocupa papel mais importante no ciclo de contaminação, enquanto a baía de espera assume importância na contaminação dos lotes provenientes de propriedades com animais negativos (SWANENBURG; URLINGS, 2001).

Infecções por *Escherichia coli* enteropatogênica é uma das principais causas de diarreia em caprinos e ovinos, nas primeiras semanas de vida. Os principais fatores que contribuem para a incidência de colibacilose são alojamento inadequado, superlotação e ausência de práticas higiênicas. Os animais são os próprios reservatórios de *E.coli* enteropatogênica, presente nas fezes, que pode permanecer por longos períodos no local de abrigo dos animais, na água e nos alimentos contaminados pelas fezes (QUINN et al., 2005). Os métodos para cultura microbiológica são ainda largamente empregados para detecção de microorganismos, mas atualmente várias alternativas têm sido pesquisadas, como os métodos moleculares, para reduzir o tempo e o trabalho na análise das amostras. Com isso, a amplificação de DNA “*in vitro*” através da PCR é mais uma alternativa para detecção de bactérias patogênicas, como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (BOHAYCHUK et al., 2005).

O presente trabalho objetivou detectar a presença de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em caprinos e ovinos da região do Submédio São Francisco, estado

de Pernambuco com o auxílio de técnicas fenotípicas e moleculares e, determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos.

2 MATERIAL E MÉTODO

2.1 Coleta e preparação das amostras

As coletas de amostras foram realizadas em rebanhos de caprinos e ovinos, de raças diversificadas, provenientes de 12 propriedades do município de Petrolina, além do Abatedouro Municipal, localizada na região do submédio São Francisco, estado de Pernambuco. Foram coletadas amostras de fezes de 480 ovinos e 240 caprinos, totalizando 720 animais (Tabela 1). As amostras provenientes do abatedouro pertenciam a animais oriundos das cidades de Dormentes-PE e Casa Nova-BA. Antes da coleta os animais foram avaliados clinicamente quanto à presença de sinais clínicos de diarreia. Somente foram coletadas amostras de animais assintomáticos.

As amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto do animal, com auxílio de luvas, em sacos plásticos novos, identificados individualmente por amostra. Em seguida, as amostras foram transportadas em caixa isotérmica contendo gelo até o Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, do *Campus* de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (Univasf).

Chegando ao laboratório, para realização das análises, as amostras foram processadas em “pools”. Para as amostras provenientes de propriedades o pool foi realizado combinando fezes de cinco animais, enquanto que para os animais de abatedouro este foi realizado pela composição das fezes de 10 animais. Um “pool” totalizou 25g de fezes das amostras.

Foram obtidos 134 “pools”. Destes, 124 pertenciam a animais provenientes das propriedades (86 pertenciam a ovinos, 38 a caprinos) e 10 do abatedouro (cinco de ovinos e cinco de caprinos). Os “pools” foram utilizados para isolamento de *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*.

Tabela 1. Coleta de amostras de fezes de caprinos e ovinos em propriedades do município de Petrolina e no abatedouro municipal, estado de Pernambuco.

Propriedades	Localização	Espécies	Caprinos	Ovinos	Total
01	N11	caprinos	80	0	80
02	Distrito do Capim	caprinos	25	0	25
03	Pau Ferro	caprinos/ovinos	35	15	50
04	C1	ovinos	0	70	70
05	N2	ovinos	0	35	35
06	N2	caprinos/ovinos	45	30	75
07	Rodeadouro	ovinos	0	70	70
08	Maria Teresa	caprinos/ovinos	5	15	20
09	Bebedouro	ovinos	0	65	65
10	C1	ovinos	0	65	65
11	C1	ovinos	0	25	25
12	C1	ovinos	0	40	40
13	Abatedouro	caprinos/ovinos	50	50	100
Total			240	480	720

2.2 Isolamento de *Salmonella* spp.

A partir de 25g de “pool” foi realizado o isolamento de *Salmonella* spp. Para tal, realizou-se um pré-enriquecimento adicionando a amostra em 225 mL de Água Peptonada Tamponada e incubou-se a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foi realizado o enriquecimento seletivo, transferindo-se 1 mL da solução para o caldo de enriquecimento Tetracionato incubados a 37°C/24h e 0,1 mL para o caldo Rappaport-Vassiliades incubados à 42°C/24h. Para o isolamento, uma alçada dos caldos de enriquecimento foi semeada em placas de Ágar Xylose-Lysine Deoxycholate (XLD), Hektoen Entérico (HE) e Ágar Sulfito de Bismuto (BS) e incubou-se+s à 37°C/24 horas (ISO 6579, 2002). De cada placa com meio seletivo, foram selecionadas três colônias características de *Salmonella* spp., que foram repicadas em Ágar Triptona de Soja (TSA), para posteriormente realizar os testes bioquímicos.

2.3 Caracterização fenotípica de *Salmonella* spp.

A partir de colônias suspeitas de *Salmonella* spp. isoladas em meio TSA, foram realizados os testes bioquímicos preliminares com os meios Ágar Três Açúcares e Ferro (TSI) e Ágar Lisina-Ferro (LIA), com auxílio de agulha de inoculação, semeando a colônia, em meios inclinados, através de picada no fundo dos tubos e estrias na rampa, com incubação à 37°C/24h. Testes bioquímicos confirmativos foram realizados posteriormente, através do teste de Urease, Teste de Indol e Teste em Ágar Fenilalanina (FA).

2.4 Caracterização Genotípica através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de *Salmonella* spp.

As colônias suspeitas de *Salmonella* spp. nos testes bioquímicos foram repicadas em Ágar Triptona Soja (TSA) e procedeu-se a extração de DNA para confirmação através da PCR.

2.4.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pela técnica de termo-extração segundo Greco et al. (2008). Uma colônia isolada foi utilizada para extração do DNA bacteriano. Para isso a colônia foi ressuspensa em 500 µl de água ultra-pura contida em microtubo estéril. Em seguida, foi colocada à 100°C por 11 minutos e logo após em gelo por 4 minutos. O lisado foi centrifugado por 2 minutos a 14000rpm. O sobrenadante contendo DNA foi recolhido e transferido para outro microtubo estéril. Foi armazenado em freezer para posteriormente ser utilizado nas análises por PCR.

2.4.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação de *Salmonella* spp.

Para confirmação molecular de *Salmonella* spp. foi amplificado parte do gene *SdiA* (274 pb) através da técnica de PCR utilizando os primers *SdiA1* (5'-AAT ATC GCT TCG TAC CAC-3') e *SdiA2* (5'- GTA GGT AAA CGA GGA GCA G – 3')

descritos por Oikonomou et al. (2008). A reação constou de 4 µl de DNA termo-extraído, 15 µM do primer *SdiA1* e 15 µM do primer *SdiA2*, 200 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTP, Tampão de enzima 1x e 2,5 unidades de Taq DNA polimerase em um volume final de 25 µl.

A reação de amplificação para o gene *SdiA* constou das seguintes etapas: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, seguida de 25 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 60°C por um minuto e 30 segundos, e extensão a 72°C por 40 segundos. Após o término dos ciclos houve uma etapa de extensão final de 72°C por quatro minutos. Em seguida, os produtos de amplificação foram analisados em gel agarose 1,5% adicionado de brometo de etídeo, visualizados sobre iluminação ultravioleta (UV) e registrados através de fotodocumentador (OIKONOMOU et al., 2008)

2.5 Soroaglutinação para identificação de *Salmonella* spp.

Após confirmação das colônias suspeitas por PCR, estas foram submetidas ao teste de soroaglutinação em lâmina (Sorokit- Probac), com soros polivalentes antiantígenos somáticos (O) e com soros polivalentes antiantígenos flagelares (H) do gênero *Salmonella*.

Quadro 1: Sorotipos de *Samonella* spp de maior importância médica.

Grupo O	Sorotipos	Antígeno Somático	Antígenos Fase 1	Flagelares Fase 2
A	<i>S. Paratyphi A</i>	1,2,12	a	*
B	<i>S. Paratyphi B</i>	1,4,5,12	b	1,2
B	<i>S. Typhimurium</i>	1,4,5,12	i	1,2
C1	<i>S. Paratyphi C</i>	6,7,Vi	c	1,5
C1	<i>S. Cholerae-suis</i>	6,7	c	1,5
D	<i>S. Typhi</i>	9,12,Vi	d	*
E	Infecções intestinais	Vários	-	-

* Sorotipos monofásicos

Fonte: Probac

Em uma lâmina, suspendeu-se uma colônia da bactéria em uma gota de solução salina, observando turvação. Em seguida, adicionou-se uma gota dos soros polivalentes somáticos. Formação de grumos, semelhantes a grãos de areia, na lâmina deve ser observada. Para as colônias que aglutinaram, realizou-se outro

teste, com o(s) soro(s) flagelar (es) correspondente ao grupo somático que apresentou positividade.

2.6 Teste de sensibilidade de isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos

A determinação da sensibilidade frente aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* spp. foi realizada a partir do método de microdiluição em caldo Muller-Hinton de acordo com o CLSI (2011) testando-se seis antibiogramas (tetraciclina, ciprofloxacina, sulfametoxazol, gentamicina, clorafenicol, ampicilina) usando as seguintes concentrações antimicrobianas: 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL, 8,0 µg/mL, 16 µg/mL, 32 µg/mL, 64 µg/mL, 128 µg/mL, 256 µg/mL e 512 µg/mL para cada um.

Na preparação do inóculo, colônias bacterianas foram incubadas em caldo Muller-Hinton overnight a 37 °C para a obtenção de uma suspensão com turvação equivalente a escala 0,5 de Mac Farland (10^8 UFC). Nos primeiros poços da microplaca foram adicionados 180µl do caldo Muller-Hilton e nos demais 100 µl. Da suspensão bacteriana foram adicionados 20 µl nos poços. Homogenizou-se e transferiu-se 100 µl até o último poço. Os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas a 37°C por 24h, em condições de aerobiose. A CIM foi determinada usando o cloreto de 2, 3, 5 trifeniltetrazólio (TTC). Foi utilizada uma cepa de referência padrão: *Salmonella* Thyphimurium ATCC 14023.

Após a leitura dos resultados da CIM, a concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada através da semeadura das diluições em ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37 °C por 16-18 horas. A concentração bactericida mínima (CBM) foi definida como a menor concentração

do antibiótico em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Foram utilizados *breakpoints* (pontos de corte) segundo recomendação da *Food and Drug Administration*- FDA (Anexo1).

2.7 Isolamento de *Escherichia coli*

Realizou-se enriquecimento adicionando 25 g do “pool” de fezes em 225 mL de Água Peptonada Tamponada e incubou-se a 37°C por 24 horas. Posteriormente,

semeou-se uma alçada do enriquecimento, em Ágar MacConkey e incubou à 37°C/24 horas. Colônias típicas de *E.coli* (lisas, de coloração rosa), foram selecionadas e repicadas em TSA, incubadas à 27°C/24h.

2.8 Caracterização fenotípica de isolados de *E.coli*

As colônias suspeitas foram submetidas a testes bioquímicos confirmativos, como utilização de açúcares (TSI), oxidação-fermentação de açúcares (GOF), motilidade e produção de indol (SIM), teste de citrato, VM, VP, conforme Quinn et al. (1994).

2.9 Caracterização filogenética de isolados de *E.coli*

Os iniciadores e a concentração de reagentes utilizados nas reações de PCR são apresentados nas tabelas 2 e 3. As PCRs foram realizadas sob condições semelhantes: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida de 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 5 segundos, temperatura de anelamento de 59°C por 10 segundos, e extensão a 72°C por 40 segundos. Após o término dos ciclos houve uma etapa de extensão final de 72°C por cinco minutos. Em seguida, os produtos de amplificação foram analisados em gel agarose 1,5% adicionado de brometo de etídeo, visualizados sobre iluminação ultravioleta (UV) e registrados através de fotodocumentador. Utilizou-se como controle positivo a ATCC 35218 de *E.coli*.

Tabela 2. Relação dos iniciadores usados para caracterização filogenética de *E. coli*.

Primer	Indicadores (5' – 3')	Produto
<i>ChuA-F</i>	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279 pb
<i>ChuA -R</i>	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>YjaA -F</i>	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211 pb
<i>YjaA -R</i>	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
<i>TspE4C2-F</i>	GAGTAATGTCTGGGGCATTCA	152 pb
<i>TspE4C2-R</i>	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Fonte: CLERMONT et al., 2000

Tabela 3. Condições da PCR dos genes de caracterização filogenética de *E.coli*.

Produtos da reação	Genes de caracterização filogenética		
	<i>ChuA</i>	<i>YjaA</i>	<i>TspE4C2</i>
Tampão de enzima	1x (10mM Tris-HCl pH 8,5 50mM KCl)		
MgCl ₂ (mM)	2	2	2
dNTPs ((mM)	2	2	2
<i>Primers</i> (pmol)	15	15	15
<i>Taq</i> DNA polimerase ¹ (U)	2.5	2.5	2.5
DNA molde (μL)	3	3	3
Água ultra pura ¹ (μL)	10	10	10
Total (μL)	25	25	25

¹ Ludwig Biotech

3 RESULTADOS

3.1 Caracterização fenotípica de isolados de *Salmonella* spp.

Nos testes fenotípicos, do total de 12 propriedades, 83,3% (10/12) apresentaram colônias suspeitas para *Salmonella* spp. Além destas, no abatedouro foram isoladas 60 colônias suspeitas em amostras de ovinos e 50 colônias suspeitas em caprinos, totalizando 110 isolados. As colônias foram submetidas aos testes bioquímicos, testes genotípicos (PCR) e soroaglutinação para confirmação de *Salmonella* spp. Após o período de incubação, observou-se a ocorrência de reação típica de *Salmonella*, que em TSI, a rampa apresenta-se alcalina (vermelha) e fundo ácido (amarelo), com ou sem produção de H₂S e em LIA, rampa e fundos alcalinos (roxo, sem alteração da cor do meio), com ou sem produção de H₂S.

3.2 PCR para identificação de *Salmonella* spp.

Um gel representativo de amplificações pela técnica de PCR para cofirmação de *Salmonella* spp. é apresentado na figura 1. Dos isolados suspeitos na bioquímica, referentes as propriedades com rebanhos de ovinos, 80% (8/10) apresentaram colônias de *Salmonella* spp. confirmadas pela PCR e nos caprinos, foram confirmadas *Salmonella* spp. em 60% (3/5) das propriedades visitadas. Das amostras de caprinos, 31,5% (12/38) foram positivas para *Salmonella* spp. e nos ovinos 20,9% (18/86) apresentaram positividade para *Salmonella* spp. na PCR.

Das amostras pertencentes ao abatedouro municipal de Petrolina, 40% (2/5) dos ovinos e 60% (3/5) dos caprinos suspeitas pelos testes bioquímico como *Salmonella* spp. foram confirmados pelo teste de PCR.

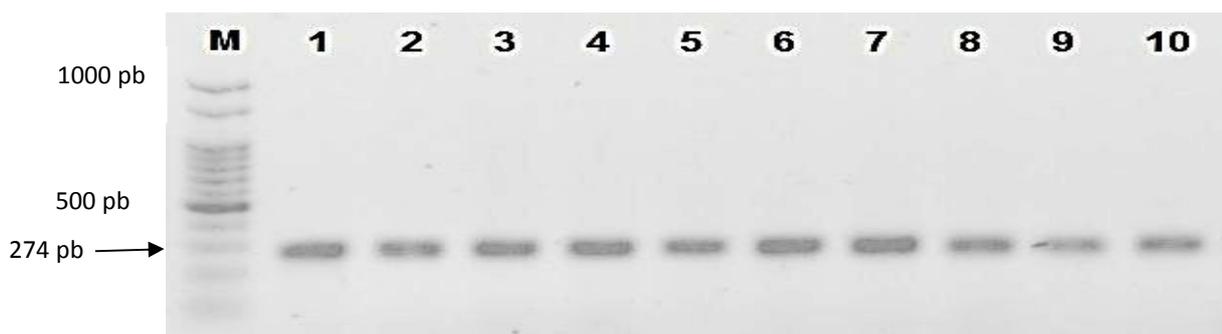


Figura 1 – Produto da PCR de *Salmonella* spp. com amplificação de 274 pb em gel de agarose. **M**: Marcador de peso molecular de 100 pb. **1**: Controle Positivo (ATCC 14023 *Salmonella* *thyphimurium*); **2 a 10**: amostras de ovinos positivas

3.3 Soroaglutinação de isolados de *Salmonella* spp.

Dos 25 isolados testados de *Salmonella* spp. confirmados na PCR, 50%(5/10) dos caprinos das propriedades foram positivos para o grupo D, 20% (2/10) para o grupo B, (2/10) e 10% (1/10) para o grupo A e D. Já dos isolados de ovinos, 40% (4/10) foram positivos para o grupo D, 20% (2/10) para o grupo B, 30% (3/10) para o grupo A e 10% (1/10) para o grupo C2. Alguns isolados (40%), tanto de caprinos como de ovinos, apresentaram positivities para mais de um grupo somático.

Das amostras do abatedouro, os caprinos apresentaram 66,7%(2/3) positividade para o grupo D e 33,3%(1/3) para o grupo C1. Porém os ovinos foram positivos 50% (1/2) para o grupo D e 50% (1/2) para o grupo A.

3.4 Teste de sensibilidade de isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos

Os resultados da CIM em caprinos estão descritos na tabela 4. Dos 20 isolados de *Salmonella* spp. de caprinos testados frente aos antimicrobianos, apresentaram resistência 50%(10/20) a oxitetracilina, 50%(10/20) a oxacilina, 20%(4/20) a clorafenicol, 15%(3/20) a gentamicina, 10%(2/20) a ampicilina e 5%(1/20) a ciprofloxacina. Nenhum isolado proveniente de caprinos apresentou resistência a sulfametoxazol. Com relação a CBM, obteve-se os seguintes resultados: resistência de 65%(13/20) a clorafenicol, 60%(12/20) a oxitetracilina, 60%(12/20) a oxacilina, 60%(12/20) a ampicilina, 45%(9/20) a sulfametoxazol, 20%(4/20) a ciprofloxacina e 15%(3/20) a gentamicina (tabela 5).

Tabela 4 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de isolados de *Salmonella* spp. em caprinos frente aos antimicrobianos.

	Concentração Inibitória Mínima (µg/ml)												Resistência	
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	n	%
Cip	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	1	1	5%
Oxi	0	1	2	3	0	4	1	1	1	0	0	0	10	50
Sul	0	0	0	0	0	2	3	0	5	1	0	0	0	0
Gen	0	0	0	0	0	3	3	3	3	0	1	0	3	15
Clo	0	0	3	0	1	4	3	1	3	1	0	0	4	20
Amp	0	0	0	0	2	0	3	1	3	1	1	3	2	10
Oxa	6	1	1	0	2	2	1	0	0	0	0	0	10	50

*Área sombreada referente aos isolados resistentes, conforme pontos de corte da FDA

Cip:ciprofloxacina; Oxi: oxitetracilina; Sul: sulfametoxazol; Gen: gentamicina; Clo: clorafenicol; Amp: ampicilina; Oxa: oxacilina

Tabela 5 – Concentrações bactericidas mínimas (CBM) de isolados de *Salmonella* spp. em caprinos frente aos antimicrobianos.

	Concentração Bactericida Mínima (µg/ml)												Resistência	
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	n	%
Cip	1	0	0	0	0	1	1	2	0	2	1	1	5	25
Oxi	11	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	12	60
Sul	9	0	0	0	0	2	0	1	0	0	0	0	9	45
Gen	0	0	1	0	1	1	2	1	1	2	1	0	3	15
Clo	13	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	13	65
Amp	3	0	1	7	1	2	0	0	0	0	0	0	12	60
Oxa	11	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	12	60

*Área sombreada referente aos isolados resistentes, conforme pontos de corte da FDA.

Cip:ciprofloxacina; Oxi: oxitetracilina; Sul: sulfametoxazol; Gen: gentamicina; Clo: clorafenicol; Amp: ampicilina; Oxa: oxacilina

Diferentemente dos resultados dos caprinos, os 20 isolados de *Salmonella* spp. provenientes de ovinos apresentaram resistência a maioria dos antimicrobianos testados (tabela 6). Dos isolados apresentaram resistência 100%(20/20) a oxitetracilina, 95%(19/20) a oxacilina, 95%(19/20) a cloranfenicol, 85%(17/20) a sulfametoxazol, 65%(13/20) a ciprofloxacina, 65%(13/20) a ampicilina e 50%(10/20) a gentamicina. Na CBM 100% dos isolados apresentaram resistência a oxitetracilina, clorafenicol e oxacilina, 95%(19/20) a sulfametoxazol, 80%(16/20) a ciprofloxacina, e 40%(8/20) a gentamicina (tabela 7).

Tabela 6 – Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de isolados de *Salmonella* spp. em ovinos frente aos antimicrobianos.

	Concentração Inibitória Mínima ($\mu\text{g/ml}$)												Resistência	
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	n	%
Cip	1	1	2	0	2	3	3	1	2	3	0	0	13	65
Oxi	17	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100
Sul	17	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	17	85
Gen	0	0	2	3	3	2	1	7	1	0	1	0	10	50
Clo	16	2	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	19	95
Amp	10	0	1	2	0	2	1	2	2	0	0	0	13	65
Oxa	16	0	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	19	95

*Área sombreada referente aos isolados resistentes, conforme pontos de corte da FDA

Cip:ciprofloxacina; Oxi: oxitracilina; Sul: sulfametoxazol; Gen: gentamicina; Clo: clorafenicol; Amp: ampicilina; Oxa: oxacilina

Tabela 7 – Concentrações bactericidas mínimas (CBM) de isolados de *Salmonella* spp. em ovinos frente aos antimicrobianos.

	Concentração Bactericida Mínima ($\mu\text{g/ml}$)												Resistência	
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	n	%
Cip	2	1	1	4	3	1	3	1	2	0	0	0	16	80
Oxi	17	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	20	100
Sul	19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	19	95
Gen	2	0	0	2	4	0	2	3	4	2	0	0	8	40
Clo	19	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100
Amp	9	0	1	2	4	1	1	0	0	0	0	0	16	80
Oxa	17	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	100

*Área sombreada referente aos isolados resistentes, conforme pontos de corte da FDA

Cip:ciprofloxacina; Oxi: oxitracilina; Sul: sulfametoxazol; Gen: gentamicina; Clo: clorafenicol; Amp: ampicilina; Oxa: oxacilina

3.5 Caracterização Fenotípica de isolados de *E.coli*

Foram isoladas *E.coli* em todas (100%) as amostras, tanto das propriedades como do abatedouro de Petrolina.

3.6 PCR de caracterização filogenética de *E.coli*

Neste estudo, 152 isolados de *E. coli* foram submetidos a PCR para identificação de grupos filogenéticos (figura 2), sendo 40 isolados de caprinos, 87 de

ovinos, 12 de caprinos do abatedouro e 13 de caprinos do abatedouro. Dos isolados obtidos das propriedades, os caprinos obtiveram 7,5% pertencente ao grupo A, 67,5% do grupo B1, 20% do grupo B2 e 5% do grupo D. Enquanto que os isolados de ovinos obtiveram positividade de 12,6% para o grupo A, 77% para o grupo B1, 4,6% para o B2 e 5,8 para o grupo D.

Já dos isolados do abatedouro, os caprinos apresentaram positividade de 41,7% para o grupo A, 33,3% para o grupo B1, 16,7% para o grupo B2 e 8,3% para o grupo D. Os isolados de ovinos foram confirmados em 7,7% para o grupo A, 69,2% para o grupo B1, 15,4% para o grupo B2 e 7,7% para o grupo D (figura 2).

O grupo com maior frequência em caprinos foi o B1, seguido do grupo B2, enquanto que dos isolados de ovinos o grupo com maior frequência foi o B1, seguido do grupo A. Dos isolados do abatedouro, os caprinos apresentaram maior frequência para o grupo A, seguido do B1 e os ovinos para o grupo B1, seguido do B2.

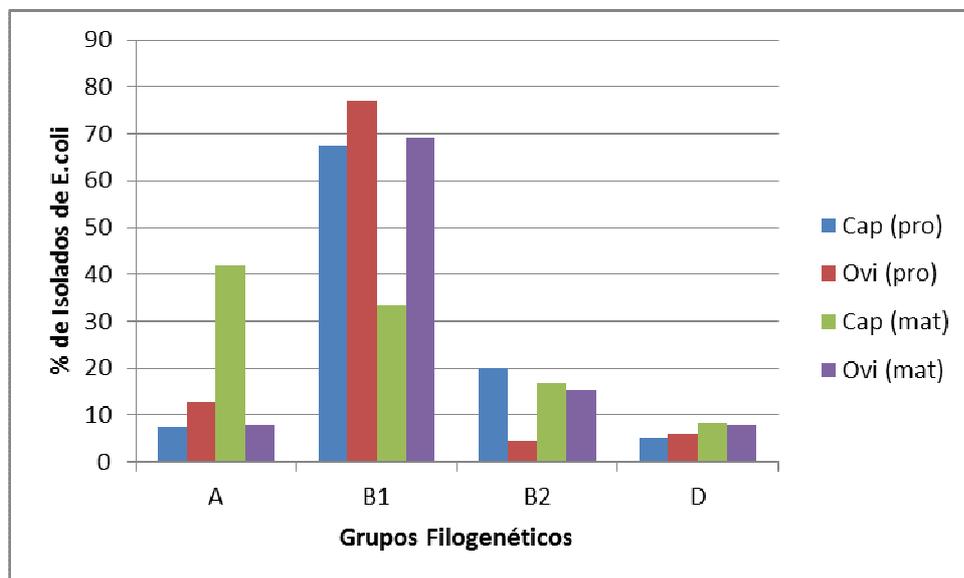


Figura 2: Porcentagem de isolados de *Escherichia coli* em caprinos e ovinos do submédio São Francisco nos grupos filogenéticos A, B1, B2 e D. Cap: caprinos; Ovi: ovinos; Pro: propriedade; Mat: matadouro

4 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo indicam ampla distribuição de *Salmonella* spp. nas fezes de caprinos e ovinos na região do submédio do Rio São Francisco.

Tanto nas amostras coletadas nas propriedades, como nas coletadas nos animais enviados ao abatedouro, os isolados de *Salmonella* spp. foram detectados em uma frequência maior em caprinos do que em ovinos. Mesmo que nossas amostras tenham sido coletadas e analisadas em pools, o que pode ter superestimado a prevalência de *Salmonella* spp. nos animais, os percentuais obtidos foram superiores aos descritos na literatura. WOLDEMARIAM et al (2005) na Etiópia encontraram uma frequência maior de *Salmonella* spp. em caprinos (8%) do que nos ovinos (2,8%). No mesmo país TEKLU & NEGUSSIE (2011) encontraram um percentual maior de *Salmonella* spp. em caprinos (11,7%) do que ovinos (7,7%). Nossos resultados diferem dos descritos por BONKE et al. (2012) que encontraram uma frequência maior de isolamentos de *Salmonella* spp. nos ovinos (34%) do que nos caprinos (2%).

Em nosso estudo *Salmonella* spp. foi isolada de animais sadios, tanto em propriedades como em abatedouro. Vários estudos apontam os pequenos ruminantes como reservatórios para *Salmonella* spp. (SANDBERG et al., 2002; WOLDEMARIAM et al., 2005; BONKE et al., 2012). Sandberg et al. (2002) isolaram *S. diarizonae* em ovinos na Noruega e esta foi associada a fêmeas adultas que foram implicadas como potencial transmissor da bactéria entre as propriedades. Duffi et al. (2009) isolaram *Salmonella* spp. em fezes de caprinos saudáveis na Austrália. No presente estudo, o isolamento de *Salmonella* spp. de animais saudáveis foi associado a animais adultos. Nos pequenos ruminantes a infecção por *Salmonella* spp. é associada a quadros entéricos e reprodutivos (ALVES et al., 2006; VANSELOW et al., 2007; FERRERAS et al., 2007; MILNES et al., 2008; LUQUE et al., 2009). Segundo BONKE et al. (2012) a infecção assintomática por *Salmonella* spp. é mais freqüente nos animais adultos. MUNOZ et al. (1996), não isolaram *Salmonella* spp. nas fezes de animais jovens sem sinais de diarreia.

Poucos dados são encontrados na literatura nacional sobre a prevalência de *Salmonella* spp. em ovinos e caprinos (PEREIRA et al., 2010), entretanto a presença

deste patógeno foi determinada em 30,8% de amostras de carne ovina comercializadas em mercados públicos de Recife (FERNANDES et al., 2009), 29,17% de carne caprina (MOURA, et al., 2007). Silva, et al. (2010) encontrou 10% destes patógenos em carnes comercializada em feiras-livres na cidade de Salvador, Bahia.

Avaliando-se os sorotipos de *Salmonella* spp. o grupo de maior prevalência foi o D (*S. Typhi*). Cepas dos sorogrupos A, B, C1, C2, D e E causam aproximadamente 99% das infecções em humanos e animais de sangue quente (POPOFF; LE MINOR, 1997). Nossos resultados destacam o potencial zoonótico dos isolados de *Salmonella* spp. obtidos dos pequenos ruminantes. Entretanto uma sorotipificação mais detalhada deve ser conduzida futuramente.

A presença de animais portadores de *Salmonella* spp. no abatedouro indica uma preocupação com a saúde pública. Segundo Berends et al. (1998), em situações de ingresso constante de animais portadores na linha de abate, medidas de sanitização e boas práticas de fabricação contribuem com menos de 10% de redução do índice de contaminação do produto final. Moscas na propriedade, fonte dos alimentos ofertados aos animais e condições de higiene são muito importantes, especialmente nas dez semanas anteriores ao abate de caprinos e ovinos (VANSELOW et al., 2007). É importante identificar animais portadores, assintomáticos de salmonelas, pois a ampla distribuição do gênero *Salmonella* entre os animais e sua permanência no ambiente contribui para que esse micro-organismo assuma papel importante na saúde pública (WEISS et al., 2002), principalmente por ser uma enfermidade zoonótica de importância mundial. Amostras de fezes coletadas de animais em baias de chegada e seleção, prontos para irem a sala de abate, caracterizando um fator preocupante, uma vez que estes micro-organismos são passados facilmente de um animal para o outro no transporte e baia de espera para o abate (SWANENBURG; URLINGS, 2001), e por serem portadores assintomáticos, alertam para a necessidade de monitorar esse micro-organismo, com vistas à segurança alimentar, tendo em vista que a contaminação de produtos cárneos, na maioria das vezes, está associada ao abate ou ao processamento (HJARTARDÓTTIR et al., 2002). A presença de animais portadores desse microrganismo ao abate também resulta em contaminação cruzada de carcaças (BANDEIRA et al., 2007) e contaminação elevada de embutidos (CASTAGNA et al.,

2004), tornando-se efetivamente um fator de risco para a contaminação do produto final (CASTAGNA et al., 2004; BANDEIRA et al., 2007). Segundo Teklu & Negussie (2011) é clara a probabilidade de contaminação das carcaças por *Salmonella* spp. oriunda das fezes dos excretadores, contudo outros fatores de risco também tem importância como a esterilização de facas.

Os percentuais de resistência aos antimicrobianos foram maiores nos ovinos do que nos caprinos. Nos ovinos a resistência foi maior ao cloranfenicol, oxacilina tetraciclina e sulfazotrim. Nossos resultados foram diferentes dos descritos por LUQUE et al. (2009) que indicou uma alta sensibilidade em isolados obtidos de aborto em ovelhas. Reduzida resistência, incluindo a tetraciclina em isolados de *Salmonella* spp. obtidas em ovinos no abatedouro também foram descritas (BONKE et al. 2012). Na Índia, pouca resistência em isolados da espécie caprina foi descrita por Chandra et al. (2006), especialmente para cloranfenicol, ampicilina e ciprofloxacina.

No presente estudo a resistência a oxitetraciclina foi elevada tanto nos caprinos como ovinos. Segundo MOLLA et al. (2007) a resistência de *Salmonella* spp. foi maior ao aminoglicosídeos e tetraciclina. Resistência a tetraciclina também foi descrita num surto ocasionado por *Salmonella* Abortusovis na Croácia (HABRUN et al.; 2006). A resistência a tetraciclina pode ser explicada por sua grande utilização na terapia de animais de produção no Brasil (MOTA et al., 2005), o que também ocorre no Vale do São Francisco. Segundo GOUSIA et al. (2011) a maior resistência de *Salmonella* spp. a penicilinas, tetraciclina, aminoglicosídeos e quinolonas está associado ao seu maior uso na terapêutica veterinária na Grécia.

No presente estudo, 18 (46%) dos isolados de *Salmonella* spp. foram multiresistentes especialmente na espécie ovina onde 16 isolados apresentaram esta característica. A multiresistência é uma grande preocupação em *Salmonella* spp. especialmente se considerarmos seu potencial zoonótico e de transmissão via alimentos (MOLLA et al., 2007). *Salmonella* spp. multi resistentes tem sido descritas em vários trabalhos tanto em isolados obtidos a partir de animais em abatedouro (WOLDEMARIAM et al., 2005; MOLLA et al., 2007), como em alimentos prontos (CHANDRA et al., 2006). A multiresistência em isolados de *Salmonella* spp. em caprinos foi associada a integrons do tipo 1 (MOLLA et al., 2007). O potencial de

transmissão de genes de resistência entre isolados de *Salmonella* spp. é bem conhecida (HELMUTH, 2000).

E.coli foram isoladas a partir de todos os animais avaliados neste estudo. Em sua maioria os isolados provenientes das fezes tanto de caprinos como ovinos pertenceram ao grupo B1. O grupo B1 também foi considerado dominante nas fezes de bovinos, caprinos e ovinos (CARLOS et al., 2010). Os mesmos autores indicam que esta característica pode estar associada com o sistema digestivo particular destes animais. Características específicas das populações comensais de *E.coli* de humanos e animais podem ser relacionadas ao tipo de ambiente e hospedeiro (ESCOBAR-PÁRAMO et al., 2006). Segundo Clermont et al. (2011) os isolados de *E.coli* de humanos e animais possuem um background genético comum, contudo diferenças são vistas na distribuição dos fatores de virulência entre cepas humanas (B2) e não humanas (não B2). Isolados de *E. coli* pertencentes ao filotipo B1, particularmente presentes nos caprinos e ovinos são consideradas de baixo potencial virulento para os seres humanos (ISHII et al., 2007; WU et al., 2012). Nos caprinos o Grupo B2 foi o segundo mais encontrado, alertando para um maior potencial de virulência. Segundo Wu et al. (2012) este grupo é o que reúne isolados com maior número de fatores de virulência. Os grupos de *E. coli* B2 e D são considerados patogênicos para os seres humanos (CLERMONT et al. 2000).

5 CONCLUSÃO

Foi determinada a presença de *Salmonella* spp. em fezes de caprinos e ovinos na região do submédio São Francisco, porém a frequência de isolados foi maior em caprinos.

Tanto nos caprinos como ovinos a maior resistência dos isolados de *Salmonella* spp. foi a oxitetraciclina. A multirresistência também foi verificada, sendo esta observada especialmente nos isolados oriundos de ovinos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABO, S., RASMUSSEN O. F., ROSSEN, L., SORENSEN, P. D., OLSEN, J. E. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. **Molecular and Cellular Probes**, London, v.7, p.171-178, 1993.

ALEMAYEHU, D., MOLLA, B. AND MUCKLE, A. Prevalence and antimicrobial resistance pattern of *Salmonella* isolates from apparently healthy slaughtered cattle in Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, 35, p.309–319, 2003.

ALENCAR, S. P., MOTA, R. A., COELHO, M. C. O. C., NASCIMENTO, S. A., ABREU, S. R. O., CASTRO, R. S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco, **Ciência animal**, v.11, n. 1, p. 131-140, Goiânia, 2010.

ALVES, F. S. F., CHAPAVAL, L., PINHEIRO, R. R. Enfermidades e microrganismos passíveis de transmissão pela carne, leite e derivados de caprinos e ovinos. Sobral: **Embrapa Caprinos**, 2006.

AUSTIN, J. W.; SANDERS, G.; KAY, W. W.; COLLINSON, S. K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS microbiology Letters**, v. 162, p. 295-301, 1998.

BANDEIRA, R.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Ocorrência de *Salmonella* sp. em cortes de pernil provenientes de lotes suínos portadores ao abate. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.2, p.203-208, 2007.

BERENDS, B. R.; VAN KNAPEN, F.; MOSSEL, D. A. A.; BURT, S. A.; SNIJDERS, J. M. A. *Salmonella* spp. on pork at cutting plants and at the retail level and the influence of particular risk factors. **International Journal of Food Microbiology**, v.44, n.3, p.207-217, 1998.

BETTELHEIM, K. A., et al. The diversity of *Escherichia coli* serotypes and biotypes in cattle faeces. **Journal of Applied Microbiology**, 2005.

BOHAYCHUCK, V. M., GENSLER, G. E.; KING, R.K.; WU, J.T.; MCMULLER, L.M. Evaluation of Detection Methods for Screening Meat and Poultry Products for the Presence of Foodborne Pathogens. **Journal of Food Protection**, v.68,n.12, p.2637-2647, 2005.

BONKE, R., WALCHECK, S., BUMANN, C., THUM, C., STÜBER, E., KÖNIG, M., STEPHAM, R., FREDRIKSSON-ALOMAA, M. High prevalence of *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* in tonsils of sheep at slaughter. **Food Research International**, v. 45, p. 880–884, 2012.

BRANHAM, L. A., CARR, M. A., SCOTT, C. B., CALLAWAY, T. R. *E. coli* O157 *Salmonella* spp. in white-tailed deer and livestock. **Curr. Issues Intest. Microbiol.** V. 6, p. 28-9, 2005.

CARLOS, C., PIRES, M.M., STOPPE, N.C., HACHICH, E.M., SATO, M.I., GOMES, T.A., AMARAL, L.A., OTTOBONI, L.M. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. **BMC Microbiology**. v.10, 2010. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/161>.

CASTAGNA, S. M. F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Presença de *Salmonella* sp. no trato intestinal e em tonsilas/linfonodos submandibulares de suínos ao abate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.300-306, 2004.

CHANDRA, M., SINGH, B.R., SHANKAR, H., AGARWAL, M., KANT, R.K., SHARMA, G., BABU, N. Study on prevalence of *Salmonella* infection in goats. **Small Ruminant Research**. n.65. p. 24–30, 2006.

CLERMONT, O., OLIER, M., HOEDE, C., DIANCOURT, L., BRISSE, S., KEROUDEAN, M., GLODT, J., PICARD, B., OSWALD, E., DENAMUR, E. Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. **Infection, Genetics and Evolution**. 11, p. 654–662, 2011.

CLERMONT, O., BONACORSI, S., BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** V. 66, p. 4555-8, 2000.

CLSI .Clinical and Laboratory Standards Institute. Performace standards fora antimicrobial susceptibility testing, sixteenth informational supplement, document M100-S16. Wayne, PA, USA: CLSI. 2011.

COHEN, N. D., McGRUDER, E. D., NEIBERGS, H. L., BEHLE, R. W., WALLIS, D. E., HARGIS, B. M. Detection of *Salmonella enteritidis* in feces from poultry using booster polymerase chain reaction and oligonucleotide primers specific for all members of the genus *Salmonella*. **Poultry Science**, Champaign, v.73, n.2, p.354–357, 1994.

CRAY JR.; W. C. THOMAS, L. A.; SCHNEIDER R. A.; MOOM H. W. Virulence attributes of *Escherichia coli* isolated from dairy heifer feces. **Veterinary Microbiology**, 1996.

DAVIES, R.H., DALZIEL, R., GIBBENS, J.C., WILESMITH, J.W., RYAN, J.M.B., EVANS, S.J., BYRNE, PAIBA, C.G.A., PASCOE, S.J.S., TEALE, C.J. National survey for *Salmonella* in pigs, cattle and sheep at slaughter in Great Britain (1999–2000). **Journal of Applied Microbiology**. 96, p. 750–760, 2004.

DUFFY, L., BARLOW, R., FEGAN, N., VANDERLINE, P. Prevalence and serotypes of *Salmonella* associated with goats at two Australian abattoirs. **Letters in Applied Microbiology**. 48, p. 193–197, 2009.

EMPARN- Empresa de Pesquisa Agropecuária do Rio Grande do Norte. **Manejo sanitário de caprinos e ovinos** / EMPARN. – Natal, RN: EMPARN, 2006.

ESCOBAR-PÁRAMO, P., LE MENAC'H, A.L., LE GALL, T., AMORIM, C., GOURIOU, S., PICARD, B., SKURNIK, D., DENAMUR, E. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. **Environmental Microbiology**. 8 (11), p. 1975–1984, 2006.

FADL, A. A.; NGUYEN, A. V.; KHAN, M. I. Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.4, p.987-989, 1995.

FDA. U.S. Food and Drug Administration. *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*.
<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/ucm070047.htm>. Acesso em: 10/11/2011.

FERNANDES, E. F. T. S.; PAULINO, A. A.; FERNANDES, M. F. T. S.; MOURA, A. P. B. L.; MOTA, R. A. Qualidade microbiológica da carne de ovinos (*Ovis aries*) comercializada nos mercados públicos do Recife-PE. **Medicina Veterinária: Recife-PE**, v.3, n.4, p.7-12, 2009.

FERRERAS, M. D.C., MUNOZ, M., PEREZ, V., BENAVIDES, J., GARCIA-PARIENTE, C., FUERTES, M., ADURIZ, G., GARCIA-MARIN, J.F. Unilateral orchitis and epididymitis caused by *Salmonella enterica* subspecies *diarizonae* infection in a ram. **J Vet Diagn Invest**.19, p. 194–197, 2007.

FURET, J.P., FIRMESSE, O., GOURMELON, M., BRIDONNEAU, C., TAP, J., MONDOT, S., DORÉ, J., CORTHER, G. Comparative assessment of human and farmanimal faecal microbiota using real-time quantitative PCR. **FEMS Microbiol Ecol** v. 68, p.351–362, 2009.

GOMES, M. J. P. Grupo das enterobacteriáceas (*Salmonella* spp.). **Microbiologia Clínica Veterinária VET 3225**. Área de Bacteriologia: UFRGS, 2012.

GOULD, I.M. Coping with antibiotic resistance: the impending crisis. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 36S3. S1–S2, 2010.

GORDON, D.M., COWLING, A. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**. 149, p. 3575–3586, 2003.

GOUSIA, P., ECONOMOU, V., SAKKAS, H., LEVEIDIOTOU, S., PAPADOPOULOU, C. Antimicrobial Resistance of Major Foodborne Pathogens from Major Meat Products. **Foodborne pathogens and disease**. v.8, Number 1, 2011.

GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Warsaw: **Epidemiol Rev**, v. 13, p. 60-98, 1991.

GUIMARAES FILHO, C. MOREIRA, J.N. Sistemas tradicionais para produção de caprinos e ovinos. **Produção de caprinos e ovinos no semiárido**. editor técnico, Tadeu Vinhas Voltolini. Petrolina: EMBRAPA, Semiárido, 2011.

GRECO, C., MASTRONARDI, C., PAGOTTO, F., MACK, D., RAMIREZ-ARCOS, S. Assessment of biofilm-forming ability of coagulase-negative staphylococci isolated from contaminated platelet preparations in Canada. **Transfusion**. 48:969-977, 2008.

HABRUN, B., LISTES, E., SPICIC, S., CVETNIC, Z., LUKACEVIC, D., JEMERSIC, L., LOJKIC, M., KOMPES, G. An Outbreak of *Salmonella* Abortusovis Abortions in Sheep in South Croatia. **J. Vet. Med.** B 53, p. 286–290, 2006.

HELMUTH, R. Antibiotic Resistance in *Salmonella*. **Salmonella in Domestic Animals**. Cap. 6, 2000.

HJARTARDÓTTIR, S., GUNNARSSON, E., SIVALDADÓTTIR, J. *Salmonella* in Sheep in Iceland. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.43, p.43-48, 2002.

HOLT, J. C. , KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of sistematic bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

IBEAGHA- AWEMU, E.M., KGWATALALA, P., IBEAGHA, A.E., ZHAO, X. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. **Mamm Genome**. 19, p. 226–245, 2008.

IBGE, Produção da Pecuária Municipal, 2010. http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/tabelas_pdf/tab16.pdf. Acesso em: 18/10/11.

ISHII, S., MEYER, K.P., SADOWSKY, M.J. Relationship between Phylogenetic Groups, Genotypic Clusters, and Virulence Gene Profiles of *Escherichia coli* Strains from Diverse Human and Animal Sources. **Applied and environmental microbiology**. p. 5703–5710, Sept., 2007.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – **Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.**, The International Organization for Stardardization, 4 ed. 2002.

JOHNSON, J. R. *et al.* Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. USA: **The Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 774-784, 2005.

KUHNERT, P.; BOERLIN P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, p. 107-117, 2000.

LANTIER, I., MORENO, C.R., BERTHON, P., SALLE, G., PITEL, F., SCHIBLER, L., GAUTIER-BOUCHARDON, A.V., BOIVIN, R., WEISBECKER, J.L., FRANCOIS, D., BOUIX, J., CRIBIUS, E.P., ELSEN, J.M., LANTIER, F. Quantitative trait loci for resistance to infection in sheep using a live *Salmonella* Abortusovis vaccine. **Animal Genetics. Stichting International Foundation for Animal Genetics**, 2012.

LEWIS, D. A. Marshmallows cause an outbreak of infection with *Salmonella enteritidis* phage type 4. **Commun. Dis. Rep. CDR Rev**, v. 6, p. 183-186. , 1997.

LIMA, R.G.S. & BAIARDI, A. **Estratégias de sobrevivência dos pequenos caprinocultores do semi-árido baiano.** Disponível em: <<http://www.66.102.1.104/scholar?hl=pt-BR&lr=&q=cache:bEN9qI-JIYJ:gipaf.cnptia.embrapa.br/itens/publ/sober2000/limargs/Paper1593.PDF++importancia+cultural+do+caprino>>. Acesso em: 18/02/2012.

LUQUE, I., ECHEITA, A., LEO'N, J., HERRERA-LEÓ, S., TARRADAS, C., GONZÁLEZ-SANZ, R., HUERTA, B., ASTORGA, R.J. *Salmonella* Indiana as a cause of abortion in ewes: Genetic diversity and resistance patterns. **Veterinary Microbiology**. 134, p. 396–399, 2009.

MACHE, A.; MENGISTU, Y.; COWLEY, S. *Salmonella* serogroups identified from adult diarrheal out-patients in Addis Ababa, Ethiopia: antibiotic resistance and plasmid profile analysis. **East. Afr. Med. J.**, v. 74, p. 183-6, 1997.

MILNES, A. S.; STEWART, I.; CLIFTON-HADLEY, F. A.; DAVIES, R. H.; NEWELL, D. G.; SAYERS, A. R.; CHEASTY, T.; CASSAR, C.; RIDLEY, A.; COOK, A. J.; EVANS, S. J.; TEALE, C. J.; SMITH, R. P.; MCNALLY, A.; TOSZEGHY, M.; FUTTER, R.; KAY, A.; PAIBA, G. A. Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic, *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. **Epidemiol. Infect.** V. 136, p. 739-51, 2008.

MOLLA, B., MIKO, A., PRIES, K., HILDEBRANDT, G., KLEER, J., SCHROETER, A., HELMUTH, R. Class 1 integrons and resistance gene cassettes among multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from slaughter animals and foods of animal origin in Ethiopia. **Acta Tropica**.103, p. 142–149, 2007.

MOLLA, W., MOLLA, B., ALEMAYEHU, D., MUCKLE, A., COLE, L., WILKIE, E. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serovars in apparently healthy slaughtered sheep and goats of central Ethiopia. **Trop Anim Health Prod** 38:p. 455–462, 2006.

MOLLA, B., MOHAMMED, A., SALAH, W. *Salmonella* prevalence and distribution of serotypes in apparently healthy slaughtered camels (*Camelus dromedarius*) in Eastern Ethiopia. **Tropical Animal Health and Production**, 36(5), 451–458, 2004.

MONDAL, T., KHAN, M.S.R., ALAM, M., PURAKAYASTHA, M. Molecular Characterization of *Salmonella* Isolates of Duck in Comparison to *Salmonella* Isolates of Chicken and Ruminants. **Bangladesh J Microbiol**, v.25, n.2, December, p.91-94, 2008.

MOTA, R. A. ; SILVA, K. P. C. ; FREITA, M. F. L. ; PORTO, W. J. N. ; SILVA, L.B.G. . Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multiresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-467, 2005.

MOURA, PINHEIRO JUNIOR, J. W., OLIVEIRA, R. B. A., DUARTE, D. A. M., RIBEIRO, A. R., REIS, A. M. F. Pesquisa de coliformes termotolerantes, totais e *Salmonella spp.* em carnes caprinas comercializadas na cidade do Recife, Pernambuco. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.74, n.4, p.293-299, out./dez, 2007.

MUÑOZ, M., ALVAREZ, M.,LANZA, I., CARMENES,P. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. **Epidemiol. Infect.** 117, p. 203-211, 1996.

NATARO, J. P., *et al.* Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2297-2304, 1992.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, p. 142-201, 1998.

OIKONOMOU, I.; HALATSI, K.; KYRIACOU, A. Selective PCR: a novel internal amplification control strategy for enhanced sensitivity in *Salmonella* diagnosis. **Lett. Appl. Microbiol.** V. 46, p. 456-61, 2008.

PAO, S., PATEL, D., KALANTARI, A., TRITSCHLER, J.P., WILDEUS, S., SAYRE, B.L. Detection of *Salmonella* Strains and *Escherichia coli* O157:H7 in Feces of Small Ruminants and Their Isolation with Various Media. **Applied and environmental microbiology**, p. 2158–2161, Apr, 2005.

PAYMENT, P.; RILEY, M.S. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call to action. **American Academy of Microbiology**. Washington, DC, 2002.

PEREIRA, J. G.; SOARES, V. M.; IZIDORO, T. B.; PINTO, J. P. A. N. *Salmonella* spp.: relevância do patógeno diante da expansão comercial da carne ovina. **Pubvet**, v. 4, n.20, 2010.

PINHEIRO, R.R.; GOUVEIA, A.M.G.; ANDRIOLI, A. Prevalência da Artrite Encefalite Caprina em reprodutores caprinos nas principais regiões leiteiras do Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 23, n. 3, p. 421-423, 1999.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. Antigenic formula of the *Salmonella* serovars, 7. **Rev. Paris**, France: WHO, 1997.

POTRON, A., POIREL, L., NORDMANN, P. Plasmid-mediated transfer of the blaNDM-1 gene in Gram-negative rods. **FEMS Microbiol Lett**. 324. p. 111–116, 2011.

QUADROS, D. G. Sistemas de produção de ovinos e caprinos de corte. **Apostila técnica Sistemas de produção de ovinos e caprinos de corte**: Salvador-BA, nov., 2005.

QUINN, P. J., et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, 648 p., 1994.

QUINN, P.J., MARKEY, B. K., CARTER, M. E., DONNELLY, W.J., LEONARD, F.C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1ª Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

RIBEIRO, S. D. A. **Caprinocultura: criação racional de caprinos**. 1ª ed. São Paulo: Nobel, 1997.

SABATÉ, M., et al. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. France: **Clin. Microbiol. and Infect.**, 2006.

SANDBERG, M., ALVSEIKE, O., SKJERVE, E. The prevalence and dynamics of *Salmonella enterica* IIIb 61:k:1,5,(7) in sheep flocks in Norway. **Preventive Veterinary Medicine**. 52, p. 267–275, 2002.

SANTOS, L.P. Caprinos e Ovinos: informações importantes. **SEBRAE**: Natal-RN, 2004.

SANTOS, T. C. P.; ALFARO, C. E. P.; FIGUEIREDO, S. M. Aspectos Sanitários e de Manejo em Criações de Caprinos e Ovinos na Microrregião de Patos, Região Semi-Árida da Paraíba. **Patos-PB: UFCG**, 2001.

SCHLAFER, D.H., YUH, B., FOLEY, G.L., ELSSASER, T.H., SADOWSKY, D., NATHANIELSZ, P.W. Effect of *Salmonella* Endotoxin Administered to the Pregnant Sheep at 133-142 Days Gestation on Fetal Oxygenation, Maternal and Fetal Adrenocorticotrophic Hormone and Cortisol, and Maternal Plasma Tumor Necrosis Factor Concentrations. **Biology of reproduction**. 50, p. 1297-1302, 1994.

SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 264-292. 2005.

SHELOBOLINA, E.S., SULLIVAN, S.A., O'NEILL, K. R., NEVIN, K. P., LOVLEY, D. R. Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Applied and Environmental Microbiology**, May, p. 2959–2965, 2004.

SILVA, E. F., MACEDO, V. P., SOUSA, F. P., VENTIN, R., COSTA, W. L. R., SILVA, M. C. A. Pesquisa de *Salmonella spp.* em carne de pequenos ruminantes comercializada em feiras-livres na cidade de Salvador – Bahia. **Universidade Federal da Bahia**, 2010.

SOUSA, S. P. **The Versatile strategies of Escherichia coli pathotypes: A mini review.** **J. Venom. Anim.Toxinsincl. Trop. Dis**, 2006.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H. A. P. *Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses. **International Journal of Food Microbiology**, v.70, n.3, p.243–254, 2001.

TEKLU, A., NEGUSSIE, H. Assessment of Risk Factors and Prevalence of *Salmonella* in Slaughtered Small Ruminants and Environment in an Export Abattoir, Modjo, Ethiopia. **American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.**, 10. p. 992-999, 2011.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L., **Microbiologia**, 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4 ed. Editora Atheneu: São Paulo, 2005.

VANSELOW, B. A.; HORNITZKY, M. A.; WALKER, K. H.; EAMENS, G. J.; BAILEY, G. D.; GILL, P. A.; COATES, K.; CORNEY, B.; CRONIN, J. P.; RENILSON, S. *Salmonella* and on-farm risk factors in healthy slaughter-age cattle and sheep in eastern Australia. **Aust. Vet. J.** v.85, p. 498-502, 2007.

VIEIRA, L. S.; CAVALCANTE, A. C. R.; XIMENES, L. F. Epidemiologia e controle das principais parasitoses de caprinos nas regiões semi-áridas do Nordeste. Sobral: **EMBRAPA-CNPC**, 50p, 1998.

WALK, S. T., ALM, E.W., CALHOUN, L.M., MLADONICKY, J.M., WHITTAM, T.S. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environmental Microbiology**. 9(9), p. 2274–2288, 2007.

WEISS, L. H. N.; NONIG, R. B.; CARDOSO, M. COSTA, M. Ocorrência de *Salmonella* sp. em suínos de terminação no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileiro**, v.22, n.3, p.101-108, 2002.

WOLDEMARIAM, E.; MOLLA, B.; ALEMAYEHU, D., MUCKLE, A. Prevalence and distribution of *Salmonella* apparently healthy slaughtered sheep and goats in Debre Zeit, Ethiopia Small Ruminant. **Research**, v.58, p.19-24, 2005.

WRAY, C., WRAY, A. *Salmonella* in Domestic Animals. **CAB International**, Cap. 12. p.209, 2000.

WU, G., EHRLICH, R., MAFURA, M., STOKES, M., SMITH, N., PRITCHARD, G.C., WOODWARD, M.J. *Escherichia coli* isolates from extraintestinal organs of livestock animals harbour diverse virulence genes and belong to multiple genetic lineages. **Veterinary Microbiology**, 2012.

ANEXO 1

Teste de sensibilidade de isolados de *Salmonella* spp. aos antimicrobianos.

Classe de Antimicrobianos	Agente Antimicrobiano	MIC (µg/ml)		
		Sensível	Intermediário	Resistente
Aminoglicosídeos	Amicacina	≤ 16	32	≥ 64
	Gentamicina	≤ 4	8	≥ 16
	Canamicina	≤ 16	32	≥ 64
	Estreptomicina	≤ 32	N/A	≥ 64
Aminopenicilinas	Ampicilina	≤ 8	16	≥ 32
Combinação de inibidores β-Lactam / β-Lactamase	Amoxicilina– Ácido Clavulanico	≤ 8 / 4	16 / 8	≥ 32 / 16
Cefaloporinas	Ceftiofur	≤ 2	4	≥ 8
	Ceftriaxona	≤ 8	16 - 32	≥ 64
	Cefalotina	≤ 8	16	≥ 32
Cefamicinas	Cefoxitina	≤ 8	16	≥ 32
Inibidores da Via Foslato	Sulfametazona/Sulfasoxazol	≤ 256	N/A	≥ 512
	Trimethoprim–Sulfamethoxazole	≤ 2 / 38	N/A	≥ 4 / 76
Fenicol	Clorafenicol	≤ 8	16	≥ 32
Quinolonas	Ciproflaxacina	≤ 1	2	≥ 4
	Ácido Nalidíxico	≤ 16	N/A	≥ 32
Tetraciclinas	Tetraciclina	≤ 4	8	≥ 16

Fonte: FDA, 2011.