

“Caracterização da resistência a antibióticos associada a isolados portugueses de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:-, a nova estirpe pandémica”

Ana Filipa Dias, Rui Seixas<sup>1</sup>, Manuela Oliveira<sup>1</sup>, Cristina Vilela<sup>1</sup>, Mónica Serrano<sup>2</sup>, Ana Jaleco<sup>2</sup>, Raquel Mareco<sup>2</sup>, Liliana Pereira<sup>2</sup>

Laboratório de Bacteriologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa<sup>1</sup> Escola Superior de saúde Atlântica<sup>2</sup>

Julho de 2012

## **Resumo**

No ano de 2010, o “Panel on Biological Hazards” (BIOHAZ) da “European Food Safety Authority” (EFSA) publicou uma Opinião Científica alertando para o número crescente de surtos no Estados Membros da União Europeia causados por estirpes de “*Salmonella* Typhimurium-like”. O Painel recomendou que estas estirpes fossem tipificadas e caracterizadas.

Na Europa, *Salmonella* spp. foi considerada em 2008 a principal causa de mortalidade associada a surtos de origem alimentar. Este microrganismo pode causar gastroenterite, bacterémia ou infecções locais em humanos podendo também afectar outras espécies animais, tais como mamíferos, aves e répteis.

*Salmonella* inclui 2500 serótipos já identificados, distribuídos por 2 espécies: *Salmonella enterica*, que inclui a maioria das serovariedades com potencial patogénico para o Homem, e *Salmonella bongori*.

Em meados da década de 90 foi relatada na Europa a emergência de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serótipo 1,4,[5],12:i:-, uma variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium. Hoje em dia este parece ser um dos principais serótipos responsável por casos de salmonelose humana a nível mundial.

O serovar 1,4,[5],12:i:- é extremamente semelhante a *S.* Typhimurium ao nível molecular, caracterizando-se pela não expressão do gene *fljB*.

O objectivo principal deste trabalho é a caracterização fenotípica dos perfis de resistência a antibióticos de estirpes identificadas como a variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium (1,4,[5], 12 :i-), isoladas em Portugal nos últimos seis anos (2006-2011).

Da colecção constituída por 187 isolados de diversas origens: clínica (n=170), ambiental (n=2), alimentar (n=1), animal (n=10) e de origem desconhecida (n=4), verificou-se que 133 isolados (72%) foram identificados, através de PCR, como a variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium,

Das 133 estirpes estudadas 85 estirpes (64%) apresentaram perfil de resistência ASSuT. Estes resultados foram confirmados através de MIC. O perfil de co-resistência de salmonellas ASSuT (n=85) para compostos antimicrobianos mais utilizados em medicina humana variou de 0% (ciprofloxacina) até 23,5% (amoxicilina com ácido clavulâmico).

O serovar 1,4,[5],12:i:- é claramente, emergente em Portugal. Associada à sua emergência, níveis preocupantes de resistência a antibióticos têm sido relatados em Portugal, e em outros países da Europa. O perfil ASSuT em *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- foi identificado em 64% dos isolados. Quase metade (49,5%) dos isolados que apresentaram o perfil ASSuT foram co-resistentes a pelo menos um dos antibióticos. Estes valores, indicam que as populações humanas e animais devem continuar a ser monitorizadas para este serovar, de forma a prevenir a disseminação de *Salmonellas* multirresistentes.

**Palavras-Chave:** *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5], 12 :i-, PCR, Resistência a antimicrobianos, Perfil ASSuT

### **Abstract**

In 2010, the European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) published a Scientific Opinion alerting for the increasing number of outbreaks in the European Union member states promoted by “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. The Panel has recommended that these strains should be further typed and characterized.

In Europe *Salmonella* spp. was considered in 2008 the main cause of mortality related to food-borne outbreaks. This microorganism may cause gastroenteritis, bacteremia and focal infections in humans that may also affect several animal species, including mammals, birds, and reptiles.

Salmonellae include 2,500 identified serotypes, distributed between 2 species: *Salmonella enterica*, which includes all major serovars that are pathogenic to humans, and *Salmonella bongori*.

In the mid-1990s the emergence of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 1,4,[5],12:i:-, a monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium, has been reported in Europe.

Nowadays it seems to be one of the major serotypes responsible for human salmonellosis cases worldwide. The 1,4,[5],12:i:- serotype is very similar to *S.*

*Typhimurium* at the molecular level, being characterized by a lack of the *fljB* gene expression.

The main objective of this project is the phenotypic characterization of antimicrobial resistant profiles in the monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium, isolated in Portugal in the last six years (2006-2011).

The collection comprised 187 isolates from different origins: clinical (n=170), environmental (n=2), food (n=1), animal (n=10) and unknown (n=4). It was verified that 133 isolates (72%) were identified by PCR, as the monophasic variant of *Salmonella* Typhimurium.

From the isolates identified as monophasic variant (n=133), 85 isolates presented the ASSuT profile. These results were confirmed by MIC. The co-resistance pattern of ASSuT isolates for antimicrobials compounds more used in human medicine ranged from 0% (ciprofloxacin) to 23.5% (amoxicillin with clavulanate acid).

The serovar 1,4,[5],12:i:- is clearly, emerging in Portugal. This emergence is associated with high resistance levels, which has been reported in Portugal and other European countries. The ASSuT profile in *Salmonella* 1,4,[5],12:i:- was detected in 64% of the isolates. Almost half (49.5%) of the isolates presenting the ASSuT profile were co-resistance to at least one antimicrobial compound. These results showed that human and animal populations should be monitored for this serovar to prevent the dissemination of multidrug resistant *Salmonella* within these populations.

**Keywords:** *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5], 12 :i-, PCR, Antimicrobial Resistance, Profile ASSuT

### **Revisão da literatura**

*Salmonella* spp. é um microorganismo de origem alimentar responsável por surtos em todo o mundo (1), pensa-se que poderá ser a principal espécie responsável pela mortalidade de origem alimentar nos Estados Unidos (2) e na Europa (3). Pode causar infecção bacteriana, gastroenterites e infecções focais em seres humanos (4) e várias espécies de animais (5).

*Salmonella* é uma bactéria intracelular facultativas, que requer invasão intracelular e colonização para causar patogenicidade (7). Após a colonização intestinal invade o epitélio, entrando nos eritrócitos, células M e células dendríticas (8). Depois de alcançar a submucosa, podem espalhar-se pela corrente sanguínea dentro dos macrófagos., atingindo os nódulos linfáticos mesentéricos e do baço (8).

Salmonelas incluem 2.500 serótipos identificados, distribuídos entre duas espécies: *Salmonella enterica*, que inclui todos os serótipos principais, que são patogénicas para os seres humanos, e *Salmonella bongori* (4).

Novas estirpes identificadas com maior virulência, podem espalhar-se rapidamente, o que representa um grave problema de saúde pública (5). Em meados dos anos 90 foi relatado na Europa, o aparecimento de uma variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium, uma vez que as estirpes de *Salmonella* são móveis, devido ao facto de possuírem flagelos, estes são codificados por diferentes genes que são expressos aliorariamente. Assim temos o gene *fliC*, para a fase do antígeno flagelar 1 e o *fliJ*B para a fase 2 do antígeno flagelar. O produto de um terceiro gene (*fliJ*A), está localizado no mesmo operão de *fliJ*B, mas bloqueia a expressão de *fliC*.

A inversão de fase é regulado por um mecanismo recombinante. O gene *Hin* regula a expressão da fase 1 e 2 do antígeno flagelar. A *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serótipo 1,4, [5], 12: i: - (1,3,5), é muito semelhante à *S.* Typhimurium a nível molecular (3), sendo caracterizado pela não expressão do gene *fliJ*B (1,5). Hoje em dia parece ser um dos principais serótipos responsáveis pelos casos de salmonelose humana em todo o mundo

(1,9), e também tem sido isolado de várias espécies de animais e produtos alimentares.

Este gene está envolvido na formação de flagelos em *Salmonella*, que é controlada pela expressão de mais de 50 genes organizados em 14 operões agrupados em três classes(10).

A disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos é um risco bem reconhecido para a saúde pública e animal (7). A resistência a antibióticos pode ser devido aos mecanismos intrínsecos, como a modificação enzimática ou alterações da permeabilidade bacteriana (4). Também pode resultar da expressão dos mecanismos de resistência adquiridos, através de mutações pontuais nos genes cromossómicos ou de aquisição de elementos móveis (plasmídeos).

A resistência a três ou mais classes de antibióticos, indica-nos a presença de um perfil MDR (Resistente a Várias Drogas) para as bactérias. Este perfil pode incluir os principais compostos antimicrobianos, o que dificulta o tratamento de infecções graves por *Salmonella* (7). Embora os níveis de resistência de *S.* typhimurium tenham vindo a diminuir em vários países europeus, a incidência do serótipo 1,4 [5], 12: i: - tem vindo a aumentar, uma vez que este serótipo está associado o perfil **ASSuT** (resistência a Ampicilina,

Estreptomicina, Sulfametoxazol e Tetraciclina). Estudos indicam que 30% dos casos de infecção humanos nos últimos 5 anos, são tetraresistentes ASSuT, ou seja, resistentes a estes 4 antibióticos.(7).

Em 2010, a European Food Safety Authority Panel (EFSA) sobre Riscos Biológicos (BIOHAZ) publicou um parecer científico alertando para o crescente número de surtos na União Europeia que afirma ser *S. Typhimurium* 1,4, [5], 12: i -, recomendando que esta estirpe deve ser tipada e caracterizada, principalmente em termos de resistência aos antimicrobianos (13).

Em Portugal, este serótipo já foi identificado em amostras de frango e carcaças de porco (14), mas estudos de caracterização genómica e fenotípica estão em falta. Neste trabalho caracterizamos em termos de resistência antimicrobiana, isolados correspondentes à variante monofásica de *S. Typhimurium* isoladas nos últimos seis anos a partir de amostras ambientais, animais e humanas que foram fornecidas pelas autoridades nacionais competentes.

### **Materiais e Métodos**

A caracterização fenotípica dos perfis de resistência a antibióticos de estirpes identificadas como a variante monofásica de *Salmonella*

*Typhimurium* (1,4,[5], 12 :i-), foi realizada do seguinte modo:

- 1) Confirmação de todas as estirpes (n=187), através de técnicas de Microbiologia Clássica;
- 2) Extração do DNA, de todas as estirpes pelo método método tiocianato de guanidina (GES);
- 3) PCR *Salmonella Typhimurium* 1,4,[5],12:i:;
- 4) Identificação do perfil de resistência ASSuT (Ampicilina, Estreptomicina, Sulfametoxazol e Tetraciclina);
- 5) Determinação da Concentração Mínima Inibitória, através de E-Test nos isolados identificados com o perfil de resistência ASSuT
- 6) Identificação dos isolados com o perfil de resistência ASSuT das *Salmonellas* com o perfil de co-resistência para os antibióticos: Amoxicilina com ácido clavulânico (AMC), Ácido Nalidíxico (Na), Ceftazidina (CAZ), Gentamicina (CN), Ciprofloxacina (CIP) e Cefotaxina (CTX);

### **1. Confirmação da identificação dos isolados de *Salmonella* 4, [5],12: i: -**

#### **1.1 População em estudo**

Neste projeto, uma colecção constituída por 187 isolados de diversas origens: clínica (n=170),

ambiental (n=2), alimentar (n=1), animal (n=10) e de origem desconhecida (n= 4) foram recolhidos em Portugal nos últimos seis anos (2006-2011) e serotipificadas pelo Instituto Nacional Ricardo Jorge (INSA) em Lisboa. A identificação destes isolados foi confirmada por PCR multiplex pelo protocolo recomendado pela EFSA, para variante monofásica da *Salmonella* Typhimurium.(6)

## 1.2 Processamento e armazenamento das amostras

Os isolados foram semeados em placas Columbia Agar com 5% de sangue de carneiro (COS) (BioMérieux) e incubadas a 37°C durante 24 horas. As características macroscópicas das colónias foram registadas, e realizada a coloração de Gram e oxidase. Até posterior processamento, estes foram armazenados em Água Peptonada Tamponada (APT) com 40% de Glicerol, a temperatura de -20°C

## 2. Extração de DNA

Os isolados foram semeados em Columbia Agar com 5% de sangue de carneiro (BioMérieux) e incubadas a 37 ° C durante 24 h. O DNA foi extraído a partir da selecção de algumas colónias usando o método tiocianato de guanidina (Pitcher, Saunders e Owen,

1989). Resumidamente, as células bacterianas foram suspensas em 100 µl de Tris-EDTA (TE) (Sigma-Aldrich) e lisadas com 500 µl de tiocianato de guanidina (AppChem). De seguida, foi adicionado 250 µl de acetato de amónio a 7,5 mmol/L (Sigma-Aldrich) e mantidas em gelo durante 10 min. Posteriormente, 500 µl de uma solução de clorofórmio (Sigma-Aldrich) com ácido isoamílico (24:1) (Sigma-Aldrich) foi adicionada à suspensão e incubada durante 10 min. Após centrifugação a 15 000 rpm (Thermo Scientific, HERAEUS Fresco 21) durante 10 min, a fase superior foi transferida para outro tubo de Eppendorf e misturada com o mesmo volume de 2-propanol a frio (Sigma-Aldrich) e centrifugada novamente a 15 000 rpm (Thermo Scientific, HERAEUS Fresco 21) durante 10 min. O pellet foi ressuspenso em 500 µl de etanol a 70% e centrifugado a 15 000 rpm (Thermo Scientific, HERAEUS Fresco 21) durante 10 min, o qual foi deixado a secar à temperatura ambiente. Os pellets foram ressuspenso em 100 µl TE e conservados a -20°C.

## 3. PCR *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:

A identificação molecular dos isolados de *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5],12:i:- foi realizada utilizando a

técnica de Multiplex PCR (Polymerase Chain Reaction), através de um protocolo desenvolvido por Tennant et al. 2010 (6). Uma solução contendo 2.5 U de Supreme NZY Taq 2x Green Master (NZYTech), 1,5 µl dos primers FFLIB (NZYTech), (5'-CTGGCGACGATCTGTCGATG-3'), RFLIA (NZYTech), (5'-GCGGTATACAGTGAATTCAC-3'), 0,5 µl dos primers Sense-59 (NZYTech), (5'-CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG-3') e Anti-Sense-83 (NZYTech), (5'-GCCATATTTTCAGCCTCTCGCCCG-3') e 3 µl de DNA, num volume total de 25 µl foi submetida ao seguinte protocolo de amplificação: 1 ciclo a 95°C durante 2 min, 30 ciclos a 95°C durante 30 s, a 64°C durante 30 s, e a 72°C durante 1 min 30 s; e um ciclo de 72°C durante 10 min. Dois produtos são amplificados, um de 1000bp, que corresponde à região intergénica *fliB-fliA* do cluster do gene flagelina, e outro de 1389bp, correspondente ao alelo *fliB*. Estes produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%. As estirpes monofásicas de *S. Typhimurium* apresentam apenas a banda com o peso de 1000bp, enquanto as estirpes bifásicas apresentam os dois produtos amplificados. Os isolados de *Salmonella* 4,[5],12:i:- CECT 7162 e o isolado de *Salmonella*

4,[5],12:i:- CECT 722, foram identificados como controlo Monofásica e Bifásica respectivamente, neste trabalho.

#### 4. Identificação do perfil de resistência ASSuT

##### 4.1 Teste de sensibilidade a antibióticos

O teste de sensibilidade a antibióticos foi realizado pelo método de difusão em disco de acordo com as directrizes do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), de 2011. Isolados confirmados por PCR para *Salmonella* 4,[5],12:i:- foram submetidos à identificação do perfil de resistência ASSuT para os seguintes antibióticos: Ampicilina (AMP), 30 µg (Oxoid), Estreptomicina (S) 25 µg (Oxoid), Sulfametoxazol (RL), 10 µg (Oxoid) e Tetraciclina (TE), 30 µg (Oxoid). (Ampicilina, Estreptomicina, Sulfametoxazol e Tetraciclina). As placas foram incubadas, a 37°C durante 16-20 horas.

##### 5. Concentração mínima inibitória

A concentração mínima inibitória (CMI) foi realizada através de E-test (BioMérieux) de acordo com as directrizes do fabricante. Isolados confirmados por PCR para *Salmonella*

4,[5],12:i- e identificados como resistentes no teste de sensibilidade a antibióticos para o perfil de resistência ASSuT foram submetidos a determinação da CMI.

Realizou-se uma suspensão com uma turvação de 0,5 na escala de McFarland, confirmada por densitómetro (Densimat, BioMérieux) e posteriormente, numa placa de Mueller Hinton Agar (MHA), colocou-se uma tira E-teste para os seguintes antibióticos: Ampicilina, (AM, 0,016-256 µg/ml) (BioMérieux), Estreptomicina (SX 0,016 – 256 µg/ml) (BioMérieux), Sulfametoxazol (RL 0,064 – 1024 µg/ml) (BioMérieux) e Tretaciclina (TE 0,016 – 256 µg/ml) (BioMérieux). As placas são colocadas a 37°C durante 16-20 horas, em aerobiose. Após o período de incubação, os halos de inibição correspondendo a determinada CMI, foram registados.

## 6. Identificação das co-resistências em isolados de *Salmonella* 4,[5],12:i- identificadas com o perfil ASSuT

Após a Identificação dos isolados identificados com o perfil de resistência ASSuT foi realizado novamente teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de difusão em disco de acordo com as directrizes do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI), de 2011 para os seguintes antibióticos seguintes: Amoxicilina com Ácido Clavulânico (AMC), 30 µg (Oxoid), Ácido Nalidíxico (Na), 30 µg (Oxoid), Ceftazidina (CAZ), 30 µg (Oxoid), Gentamicina (CN) 10 µg (Oxoid), Ciprofloxacina (CIP) 5 µg (Oxoid), Cefotaxina (CTX) 30 µg (Oxoid) e Clorofenicol (C) 30 µg. As placas foram colocadas a 37°C durante 16-20 horas

## Resultados e Discussão

Este projecto estudou uma colecção de 187 isolados, sendo que os números no gráfico seguinte, representam o número de isolados de determinada origem previamente serotipificados.

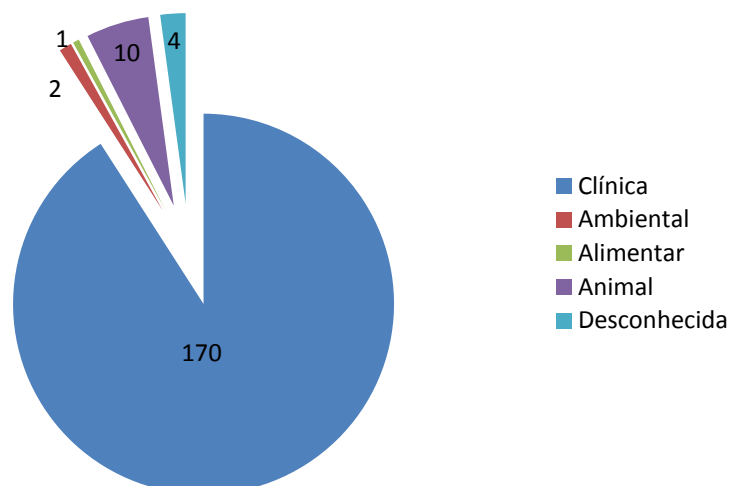




Gráfico 1: Origem das diferentes isoladas de *Salmonella* spp.

Neste trabalho os 187 isolados foram confirmados por PCR para *Salmonella* Typhimurium 1,4,[5], 12 :-i-. Da colecção inicial (n=187), 133 isolados (72%) foram confirmados como a variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium.

A serotificação é o método de eleição para o diagnóstico dos diferentes serótipos de *Salmonella*. A combinação da serotificação com o PCR indicado pela EFSA (7) demonstra uma maior fiabilidade nos resultados obtidos, evitando erros no diagnóstico clínico que poderão comprometer a terapêutica antimicrobiana. Além disso, a serotificação é uma técnica que exige padronização e validação, assim como técnicos experientes para a realizar, o que, na sua falta, pode levar a falsos negativos.

Além disso, a expressão de aglutinação flagelar é mais ténua que a aglutinação somática e fracas reacções positivas podem passar despercebidas.

Outros estudos, com 122 isolados de origem humana e animal (16) obtiveram uma maior percentagem de isolados confirmados por PCR (95%).

Apesar do nosso resultado ser relativamente mais baixo, (72%) a combinação das técnicas fenotípicas (serotificação) com técnicas moleculares (PCR) demonstra a importância que a confirmação da

identificação tem para a emissão de resultados clínicos e estudos epidemiológicos.

A prevalência de salmonela monofásica na Europa tem vindo a aumentar (14).

Nas 133 estirpes confirmadas por PCR para *Salmonella* monofásica foi realizado o teste de susceptibilidade a antibióticos (TSA) para o perfil ASSuT. Verificou-se que 85 estirpes (64%) apresentaram resistência aos quatro fármacos (Ampicilina, Estreptomicina, Sulfametozaxol e Tetraciclina). A ocorrência de estirpes resistentes aos agentes antimicrobianos dificulta a escolha terapêutica, representando um factor agravante no controlo da infecção humana e animal (6). Esta variante de *Salmonella* tem estado associado ao perfil de resistências ASSuT, sendo o padrão mais frequentemente isolado. Cerca de 30% dos casos de infecções humanas nos últimos 5 anos, estão associados à tetraresistência ASSuT (7).

A resistência a antimicrobianos em *S.* Typhimurium tornou-se bastante comum em meados da década de 60, mas teve um aumento drástico na década de 90. Mundialmente, o número de estirpes que apresentam resistência aos compostos antimicrobianos, inclusive cefalosporinas de largo espectro e quinolonas, tem aumentado

significativamente sendo relatadas em diversos estudos (10).

Os resultados obtidos através de TSA demonstram uma prevalência de 64% do perfil ASSuT nas *Salmonellas* monofásicas. Outros estudos já demonstraram percentagens semelhantes ou superiores em outros países da Europa, nomeadamente Itália.(16)

O aumento da resistência a antibióticos, especialmente ao perfil ASSuT, pode estar associado ao surgimento de estirpes multi-resistentes a fármacos, sendo este facto bastante preocupante para a medicina humana e veterinária (4)

Por fim, os isolados confirmados por PCR e tendo um perfil ASSuT foram submetidos a determinação da CMI. A

actividade antimicrobiana de um composto pode ser quantificada com base na determinação da concentração mínima desse composto, ou seja, pela capacidade de um antibiótico inibir o crescimento de bactérias em cultura, designa-se de **CIM** (Concentração Inibitória Mínima), ou **MIC** ("Minimum Inhibitory Concentration").

Os resultados obtidos por TSA foram confirmados através de MIC por E-test (Biomèrieux). Todos os 85 isolados com o perfil ASSuT demonstraram concordância entre os resultados obtidos por TSA e MIC. O valores de MIC mais frequentes foram para a Ampicilina > 256 µg/ml, Esteptomicina > 1024 µg/ml, Tetraciclina 64 µg/ml e por fim para o Sulfametoxazol, >1024 µg/ml.

Foi também avaliado o perfil de co-resistência dos isolados ASSuT (n=85) cujos resultados estão apresentados no gráfico 2, que indica a percentagem de isolados resistentes aos antibióticos estudados (Amoxicilina com Ácido Clavulânico (AMC), Ácido Nalidíxico (Na), Ceftazidina (CAZ), Gentamicina (CN), Ciprofloxacina (CIP), Cefotaxina (CTX) e Clorofenicol (C)).

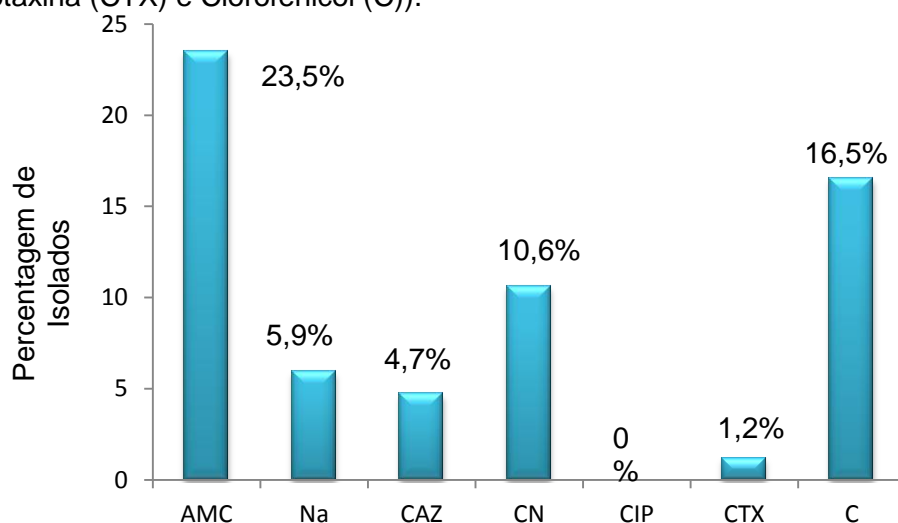


Gráfico 2: Percentagem do número de isolados resistente a cada antibiótico

De entre os 85 isolados avaliados, observou-se que os 49,4% dos isolados apresentaram resistência a um ou mais dos antimicrobianos testados. Verificou-se maiores valores percentuais de resistência no antibiótico Amoxicilina com Ácido Clavulâmico (23,5%), seguida de Cloranfenicol (16,5%), Gentamicina (10,6%), Ácido Nalidíxico (5,9%), Ceftazidina (4,7%) e por fim Cefotaxina (1,2%). O valor de co-resistências variou de 0% (ciprofloxacina) até 23,5% (amoxicilina com ácido clavulâmico).

### **Conclusão**

Na Europa, *Salmonella* spp. foi considerada em 2008 a principal causa de mortalidade associada a surtos de origem alimentar, sendo este um aspecto bastante relevante a considerar na questão de saúde pública.

Em meados da década de 90 foi relatada na Europa a emergência de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serótipo 1,4,[5],12:i:-, uma variante monofásica de *Salmonella* Typhimurium. Hoje em dia este parece ser um dos principais serótipos responsável por casos de salmonelose humana a nível mundial.

A combinação da serotipificação com o PCR recomendado, revela-se neste estudo extremamente importante, uma vez que dos 187 isolados, 133 foram confirmados como a variante monofásica.

No serótipo 1,4,[5], 12 :i-, detectou-se em 64% dos isolados o perfil ASSuT, o que pode ser bastante relevante na escolha da terapêutica antimicrobiana, principalmente em medicina humana.

Os perfis multirresistentes são de extrema importância, já que nos permite realizar uma melhor escolha do agente antimicrobiano a ser utilizado, de maneira a evitar falhas nos tratamentos.

Os resultados indicam que as populações humanas e animais devem continuar a ser monitorizadas para este serovar, de forma a prevenir a disseminação de *Salmonellas* multirresistentes nestas populações.

### **Agradecimentos**

Reconhecendo que este trabalho é fruto de apoio incondicional prestado por várias pessoas e instituições, a estas exprimo o meu profundo sentimento de gratidão. Mesmo com o risco de não mencionar todos, passo a mencionar alguns:

À Professora Doutora Cristina Lobo Vilela, por esta grande oportunidade de realizar este projecto no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV, pela sua compreensão, conhecimentos, boa disposição, motivação e incentivo.

Aos meus orientadores, Doutora Manuela Oliveira e Doutor Rui Seixas por terem orientado com sabedoria paciência e amizade este trabalho.

À Professora Mónica Serrano, pelo seu acompanhamento ao longo destes meses, o meu profundo agradecimento, por toda a vontade, conhecimento e confiança foram fundamentais para o sucesso deste projecto.

À minha família, ao meu namorado Francisco Maria, e aos meus pais pelo estímulo nos momentos de desânimo e pelo carinho na hora certa.

A todos os meus colegas de laboratório das diferentes áreas de análise e

investigação da FMV, pela boa disposição, humor contagiante, companheirismo.

Não me esquecerei dos meus amigos e colegas do curso de Análises Clínicas que me deram o apoio moral quando a família não estava por perto e continuaram sempre que precisei. Obrigada Inês Fernandes, Raquel Silva, Cláudia Soares, Pedro Sousa, Francisca Figueira, Vanessa Carvalho e Gabriela Drabeck.

À Escola Superior de saúde Atlântica, mais propriamente à Doutora Raquel Mareco e Doutora Liliana Pereira, por toda a formação disponível.

A Deus, a Ele dedico todo este trabalho.

E por último mas não menos importante, CIISA que financiou este projecto. Obrigado!

### **Bibliografia**

1. Switt, A. I. M.; Soyer, Y.; Warnick, L. D.; Wiedmann, M. 2009. Emergence, Distribution, and Molecular and Phenotypic Characteristics of *Salmonella enterica* Serotype 4,5,12:i:–. *Foodborne Pathogens and Disease*. 6, 407-415.

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

3.EECDC; EFSA - Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); CVMP-EMA; SCENIHR. 2009. Joint Opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. EFSA Journal. 7,1372.

4.Foley, S. L.; Lynne, A. M. 2008. Food animal-associated *Salmonella* challenges: Pathogenicity and antimicrobial resistance. Journal of Animal Science. 86, 173–187.

5.Hauser, E.; Tietze, E.; Helmuth, R.; Junker, E.; Blank, K.; Prager, R.; Rabsch, W.; Appel, B.; Fruth, A.; Malorny, B. 2010. Pork Contaminated with *Salmonella* enterica Serovar 4,[5],12:i:, an Emerging Health Risk for Humans. Applied and Environmental Microbiology. 76, 4601–4610.

6.Tennant, S. M.; Diallo, S.; Levy, H.; Livio, S.; Sow, S. O.; Tapia, M.; Fields, P. I.; Mikoleit, M.; Tamboura, B.; Kotloff, K. L.; Nataro, J. P.; Galen, J. E.; Levine, M. M. 2010. Identification by PCR of Non-typhoidal *Salmonella* enterica Serovars Associated with Invasive Infections among Febrile Patients in Mali. PLoS Neglected Tropical Diseases. 4, 621.

7.EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). 2010. Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of “*Salmonella* Typhimurium-like” strains. EFSA Journal. 8, 1826.

8.Ibarra, J. A.; Steele-Mortimer, O. 2009. Salmonell, the ultimate insider: *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. Cell Microbiology. 11, 1579-1586.

9. Foley, S. L.; Lynne, A. M.; Nayak, R. 2008b. Salmonella challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. Journal of Animal Science. 86, 149-162.

10.Ikebe, T.; lyodat, S.; Kutsukake, K. 1999. Structure and expression of the *fliA* operon of *Salmonella* typhimurium. Microbiology. 145, 1389-1396.

11.Janssens, J. C. A.; Steenackers, H.; Robijns, S.; Gellens, E.; Levin, J.; Zhao, H.; Hermans, K.; De Coster, D.; Verhoeven, T. L.; Marchal, K.; Vanderleyden, J.; De Vos,

D. E.; De Keersmaecker, S. J. C. 2008. Brominated Furanones Inhibit Biofilm Formation by *Salmonella* enterica Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. 74, 6639–6648.

12.Vieira-Pinto, M.; Tenreiro, R.; Martins, C. 2006. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*. 110, 77–84.

13.Gil, S.; Spagnuolo-Weaver, M.; Canals, A.; Sepúlveda, N.; Oliveira, J.; Aleixo, A.; Allan, G.; Leitão, A. C.; Martins, C. L. V. 2003. Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Archives of Virology*. 184, 2077-2097.

14.Machado, J.; Bernardo, F. 1990. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. *Journal of Applied Bacteriology*. 69, 477-480.

15.Vieira-Pinto, M.; Temudo, P.; Martins, C. 2005. Occurrence of salmonella in the ileum, ileocolic lymph nodes, tonsils, mandibular lymph nodes and carcasses of pigs slaughtered for consumption. *Journal of Veterinary Medicine Serie B Infectious Disease Veterinary Public Health*. 52, 476-481

16.K L Hopkins ; M Kirchner; B Guerra; S A Granier;C Lucarell; M C Porrero;A Jakubczak;E J Threlfall; D. J Mevius. 2010. Multiresistant *Salmonella* enterica serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro Surveill*. 2010;15(22)