

PERFIL DE SENSIBILIDADE DE *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis ISOLADA DE AVES, FRENTE A DROGAS E SUBSTÂNCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUZIDAS POR *Lactobacillus reuteri* E *Lactobacillus salivarius*.

Edna Tereza de Lima
Raphael Lucio Andreatti Filho¹
Guilherme Augusto Marietto Gonçalves
Ticiania Silva Rocha
Anita Menconi
Adriano Sakai Okamoto

RESUMO

Neste trabalho verificou-se o perfil de sensibilidade e resistência de 15 amostras de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (SE) frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *L. salivarius* e detecção do gene de resistência antimicrobiana (*integron* classe 1) utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Estreptomicina, ciprofloxacina e ampicilina apresentaram 100% de efetividade frente às amostras, enquanto a enrofloxacin e tetraciclina os menores percentuais (66,7% e 60%). A maior resistência das amostras foi observada para tetraciclina (40%) e a menor para trimetoprim (6,6%) e cefaclor (6,6%). A sensibilidade das 15 amostras de SE frente às substâncias antimicrobianas produzidas por *L. salivarius* foi de 100% no método de antagonismo “spot on the lawn”, com zonas de inibição variando entre 16 a 24mm, enquanto 86,7% das amostras (13) foram sensíveis ao *L. reuteri* formando zonas de inibição em torno de 14 a 22mm e duas (13,3%) resistentes. No método de antagonismo simultâneo de difusão em poços, utilizando o sobrenadante livre de células de *Lactobacillus*, verificou-se ação antagonista indicativa de substâncias de natureza protéica, no qual a sensibilidade e resistência de *L. reuteri* frente a SE foi de 46,7% e 53,3% respectivamente, com zonas de inibição entre 13 e 15mm enquanto *L. salivarius* apresentou índice de sensibilidade de 33,4% e resistência de 66,6%. Os produtos da PCR das amostras de SE amplificados para a seqüência do gene de resistência antimicrobiana (*integron* classe 1), não apresentaram banda em gel de agarose correspondente a amplificação do segmento genômico (900pb), não havendo relação entre a presença do gene de resistência antimicrobiana e a resistência da SE frente às drogas utilizadas.

Palavras-chave: substâncias antimicrobianas, *Lactobacillus*, sensibilidade microbiana, *Salmonella*, aves.

SENSITIVITY PROFILE OF *Salmonella enterica* serovar Enteritidis ISOLATED FROM CHICKENS, FACED WITH DRUGS AND ANTIMICROBIAL SUBSTANCES PRODUCED BY *Lactobacillus reuteri* AND *Lactobacillus salivarius*.

ABSTRACT

The present work verified the sensitivity and resistance profile of 15 samples of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (SE) faced with drugs and antimicrobial substances produced by *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus salivarius*, and detection of antimicrobial resistance gene (*integron* class 1) utilizing the polymerase chain reaction technique (PCR). Streptomycin, ciprofloxacin and ampicillin

¹Autor para correspondência: andreatti@fmvz.unesp.br

Serviço de Ornitopatologia - Departamento de Clínica Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - Campus Botucatu - SP - 18618-000.

presented 100% efficiency against all samples, while enrofloxacin and tetracycline showed the lowest percentages (66.7% and 60%). The highest sample resistance was observed for tetracycline (40%) and the lowest for trimethoprim (6.6%) and cefaclor (6.6%). The sensitivity of 15 SE samples faced with antimicrobial substances produced by *L. salivarius* was 100% in the “spot on the lawn” antagonism method, with inhibition zones varying between 16 and 24mm, while 86.7% samples (13) were sensitive to *L. reuteri* forming inhibition zones of about 14 to 22mm and two (13.3%) were resistant. The simultaneous antagonism method of diffusion into wells, utilizing free *Lactobacillus* supernatant, verified antagonistic action indicative of substances of a protein nature, in which the sensitivity and resistance of *L. reuteri* faced SE were 46.7% and 53.3% respectively, with inhibition zones between 13 and 15mm while *L. salivarius* presented 33.4% sensitivity and resistance index around 66.6%. The PCR products of SE samples amplified for the antimicrobial resistance gene sequence (*integron* class 1), did not present agarose gel band correspondent to amplification of the genome segment (900pb), then there was no relation between the presence of antimicrobial resistance gene and SE resistance against used drugs.

Key words: antimicrobial substances, *Lactobacillus*, microbial sensitivity, *Salmonella*, aviculture.

PERFIL DE SENSIBILIDAD DE *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis AISLADA DE AVES, FRENTE A FÁRMACOS Y SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS PRODUCIDAS POR *Lactobacillus reuteri* Y *Lactobacillus salivarius*.

RESUMEN

En este trabajo se verificó el perfil de sensibilidad y resistencia de 15 muestras de *Salmonella enterica* serovariedad Enteritidis (SE) frente a fármacos y sustancias antimicrobianas producidas por *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus salivarius*, con detección ulterior del gen de resistencia antimicrobiana (*integron* clase 1) utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La estreptomina, ciprofloxacina y ampicilina presentaron 100% de efectividad delante las muestras, mientras que enrofloxacin y tetraciclina presentaron los porcentajes más bajos (66.7% y 60%). La mayor resistencia de las muestras fue observadas para tetraciclina (40%) y la menor para el trimetoprim (6.6%) y cefaclor (6.6%). El índice de sensibilidad de las 15 muestras de SE frente a las sustancias antimicrobianas producidas por *L. salivarius* fue de 100% mediante el método de antagonismo “spot on the law”, con áreas de inhibición que variaron entre 16 y 24 mm, mientras que 86.7% muestras (13) fueron sensibles a *L. reuteri* formando áreas de inhibición en torno de 14 a 22 mm y dos (13.3%) resistentes. Mediante el método de antagonismo simultáneo de difusión en pozos, usando el sobrenadante libre de células de las muestras de *Lactobacillus*, se verificó la acción antagónica indicativa de sustancias de naturaleza proteica, donde la sensibilidad y resistencia de *L. reuteri* frente a SE fue de 46.7% y 53.3% respectivamente, con áreas de inhibición de entre 13 a 15 mm, mientras que *L. salivarius* presentó índice de sensibilidad de 33.4% y resistencia en torno de 66.6%. Los productos de PCR de las muestras de SE amplificadas para la secuencia del gen de resistencia antimicrobiana (*integron* clase 1) no presentaron banda en el gel de agarosa correspondiente a la amplificación del segmento genómico (900pb), no hubo relación entre la presencia del gen de resistencia antimicrobiana y la resistencia de SE frente a los fármacos utilizados.

Palabras-clave: sustancias antimicrobianas, *Lactobacillus*, sensibilidad microbiana, *Salmonella*, avicultura.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* são importantes causas de infecções alimentares em todo o mundo (JAY, 2000). Nos últimos anos tem-se observado, aumento de salmonelose humana pelo sorotipo Enteritidis (SE), relacionado com o consumo de produtos avícolas (CENTER FOR DISEASE CONTROL, 2007), cuja transmissão é de difícil controle pela complexidade da sua epidemiologia e por envolver grande número de reservatórios envolvidos na excreção fecal e contaminação ambiental (ANDREATTI FILHO, 2007). Uma das ações para controle desta enfermidade fundamenta-se no uso de antimicrobianos, que inativa os microrganismos (PALERMO NETO, 2001), e melhoram o

desempenho zootécnico das aves (FURLAN et al., 2004).

Diversos sorotipos de *Salmonella* têm demonstrado multiresistência a diferentes antimicrobianos (GUTIÉRREZ et al., 2000). A transferência de gene de resistência destes microrganismos é mediada por plasmídeos (AMABILE-CUEVAS e CHICUREL, 1992), transposons (SALYERS et al., 1995) ou bacteriófagos (STOKES e HALL, 1989). A resistência antimicrobiana é relacionada a presença do *integron* que ocorre nos plasmídeos ou integrados dentro do próprio cromossomo bacteriano. São reconhecidos atualmente quatro classes de *integron*, das quais a classe 1 é a predominante entre os membros da família *Enterobacteriaceae*, em linhagens pertencentes à microbiota entérica e patogênica dos animais (GOLDSTEIN et al., 2001).

A alta frequência de bactérias potencialmente patogênicas para animais e seres humanos presentes em produtos de origem animal, e o aumento da pressão seletiva para linhagens multiresistentes pelo uso de antimicrobianos utilizados como suplementos alimentares, levaram as autoridades ao questionamento do uso indiscriminado de antimicrobianos como aditivos em rações animais, culminando com a proibição do uso de drogas como “promotores de crescimento” pela União Européia a partir de 2006 (COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION, 2006).

As alternativas para a substituição dos antimicrobianos como promotores de crescimento são os prebióticos, probióticos, acidificantes (ácidos orgânicos), enzimas e fitoterápicos (MROZ, 2003), que não causam danos a microbiota intestinal normal e não deixam resíduos na carcaça dos animais (FULLER, 1989). O uso de bactérias como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Bacterioides* e *Bifidobacterium* como probióticos é fundamentado na avaliação de seus produtos de metabolismo, bem como pelo seu potencial de colonização em locais específicos (FRETER et al., 1983).

A eficácia e o espectro de ação de bactérias probióticas contra microrganismos patogênicos ocorre devido a vários metabólitos produzidos por essas bactérias (SERVIN e COCONIER, 2003) denominados de substâncias antagonicas, que incluem os ácidos orgânicos (lático e acético), bacteriófagos e peróxido de hidrogênio (GILLILAND e SPECK, 1972).

A produção de proteínas específicas ou complexo de proteínas denominadas bacteriocinas (TAGG et al., 1976; KLAENHAMMER, 1988) formadas por peptídeos com ação bactericida ou bacteriostática, também demonstram atividade antagonica contra microrganismos patogênicos (BRUNO e MONTVILLE, 1993).

O presente estudo investigou o perfil de sensibilidade e resistência de *Salmonella* Enteritidis (SE) isoladas de aves (*Gallus gallus*, LINNAEUS, 1758) frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*, e a presença do gene de resistência antimicrobiana *integron* classe 1 pela PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro*

Foram utilizadas 15 amostras de SE para verificar o perfil de sensibilidade e resistência antimicrobiana. As amostras foram isoladas de órgãos como fígado, coração, saco vitelino, cecos, baço, ovário e oviduto de aves reprodutoras, poedeiras e frangos de corte no Laboratório de Ornitopatologia da FMVZ – UNESP – Campus Botucatu (ANDREATTI FILHO et al., 2001) e posteriormente sorotipadas no Instituto Adolfo Lutz – São Paulo – SP (POPOF e MINOR, 1992).

SENSIBILIDADE DE SE FRENTE A DROGAS ANTIMICROBIANAS

O perfil de sensibilidade e resistência das amostras às drogas antimicrobianas: trimetoprim (5µg), estreptomicina (10µg), enrofloxacina (5µg), cefclor (30µg), ciprofloxacina (5µg), ampicilina (10µg) e tetraciclina (30µg) foi verificado utilizando o método de difusão com discos CLSI/NCCLS (2003). Cada amostra de SE foi transferida para tubos contendo 5mL de caldo Müller-Hinton e incubadas por seis horas à temperatura de 37°C. Posteriormente as culturas foram semeadas com auxílio de suabes estéreis em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton. Para completa absorção da cultura, as placas foram deixadas em repouso durante cinco minutos. Em seguida, oito discos de antimicrobianos foram depositados sobre a superfície de cada placa com auxílio de pinça estéril e incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período, realizou-se a leitura dos halos de inibição formados ao redor dos discos. Os resultados foram analisados com auxílio de tabela padrão como sensível, intermediário e resistente (CLSI / NCCLS, 2003).

SENSIBILIDADE DE SE FRENTE A SUBSTÂNCIAS ANTAGÔNICAS

MÉTODO “SPOT ON THE LAWN”

A atividade inibitória das substâncias antagônicas produzidas por amostras de *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius* frente a SE foi verificada utilizando-se os métodos de antagonismo “spot on the lawn” e antagonismo simultâneo de difusão em poços.

Para o método de antagonismo “spot on the lawn” modificado de acordo com Harris et al. (1989), as espécies de *L. reuteri* e *L. salivarius* isoladas do ingluvío e cecos de matrizes pesadas em produção, provenientes da bacterioteca do Laboratório de Ornitopatologia (LIMA et al., 2007), foram reativadas em caldo DeMan-Rugosa-Sharpe (MRS), com incubação a 37°C por 48 horas em anaerobiose. Posteriormente, 25µL de cada cultura foram semeados sob forma de pontos em placas de Petri contendo ágar MRS e incubadas a 37°C por 18 horas.

Após o período de incubação, 200µL da cultura do microrganismo indicador (SE) foram transferidos para tubos contendo 20mL de infusão de cérebro e coração (ICC) acrescidos de 0,85% de ágar, previamente preparados e mantidos em banho-maria a 45°C, vertidos nas placas contendo as culturas produtoras (*L. reuteri* e *L. salivarius*). Após a completa solidificação da camada superior, as placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. O antagonismo foi detectado pela presença de zonas de inibição ao redor das culturas.

MÉTODO DE DIFUSÃO EM POÇOS

Utilizando o método de antagonismo simultâneo de difusão em poços de acordo com Lewus e Montville (1991), as espécies de *L. reuteri* e *L. salivarius* foram semeadas em tubos contendo 5mL de caldo MRS modificado, acrescidos de 0,05% de glicose e incubados em aerobiose a 37°C, por 18 horas. As culturas foram centrifugadas a 6600g por 10 minutos. Aos sobrenadantes livres de células ajustou-se o pH para 5,5 e realizou-se a microfiltração com membrana de poro Millex-GV de 0,22µm e 25mm de diâmetro.

Posteriormente, 100µL da cultura do microrganismo indicador (SE) foram transferidos a 20mL de caldo nutriente acrescido com 0,85% de ágar. O conteúdo das culturas foi vertido em placas de Petri e após a completa solidificação, poços de 6mm foram perfurados e 60µL do sobrenadante livre de células foram depositados em cada poço. As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 24 horas. O antagonismo foi detectado pela presença de zonas de inibição e mensurado da borda do orifício (poços) até o final da zona de inibição (mm).

DETECÇÃO DO GENE DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Para detecção do gene de resistência antimicrobiana (*integron* classe 1), foi utilizada a técnica de PCR. O lisado das amostras de SE foi obtido do cultivo bacteriano por 24 horas a 41°C em ágar verde brilhante (AVB). Colônias foram transferidas para microtubos contendo 1,5mL de água ultrapura, os quais foram agitados em vortex até atingir a turbidez equivalente ao tubo 3 (10³) da escala de MacFarland, com posterior centrifugação a 30000g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado 1mL de água ultrapura. Esta suspensão foi submetida à temperatura de 100°C por 10 minutos, seguindo de choque térmico em gelo e centrifugação a 30000g por 5 minutos a temperatura de 4°C. O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi transferido para novo microtubo e armazenado a -20°C (ÁLVAREZ et al., 2003).

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do DNA foram sintetizados com base nas seqüências 5' GGC ATC CAA GCA GCA AG 3' (primer 1) e 5' AAG CAG ACT TGA CCT GA 3' (primer 2) para o gene de resistência antimicrobiana (900pb) que integra a classe 1 - *integron* (BIRNBOIM e DOLY, 1979; GOLDSTEIN et al., 2001; ÁLVAREZ et al., 2003).

A PCR foi realizada em termociclador (Eppendorf AG Mastercycler Gradient) com volume final de 50µL. Aos microtubos foram adicionados tampão para PCR 1 X (100mM Tris-HCl pH 8,8 a 25°C, 50mM KCl, 15mM MgCl₂), 1µM de cada um dos oligonucleotídeos, 1 U de DNA Taq polimerase, 0,2mM de cada desoxinucleotídeos trifosfato (dNTP), 13µL água ultrapura e 15µL do lisado bacteriano de cada isolado. A amplificação foi realizada com base no seguinte ciclo: desnaturação de 94°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, anelamento de 54°C por 1 minuto e extensão das fitas de DNA a 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72°C por 10 minutos (SILVA et al., 2006).

Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5%, contendo brometo de etídio. Como marcador de peso molecular utilizou-se DNA ladder 100pb e a visualização foi realizada em transiluminador.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando o perfil de sensibilidade das 15 amostras de SE frente aos diferentes antimicrobianos testados, foi verificado que a estreptomicina, a ciprofloxacina e a ampicilina apresentaram maior efetividade (100%) frente às amostras, seguido do cefaclor e trimetoprim (93,4%). A tetraciclina apresentou maior percentual de resistência (40%) frente aos isolados, conforme se verifica na Tabela 1.

TABELA 1. Sensibilidade microbiana de 15 amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de produtos avícolas, FMVZ – UNESP – Botucatu, 2001.

Antimicrobianos	Número de amostras sensíveis / n° testadas (%)	Número de amostras intermediárias / n° testadas (%)	Número de amostras resistentes / n° testadas (%)
Trimetoprim	14 / 15 (93,4) *	00 / 15 (0,0) **	01 / 15 (6,6) ***
Estreptomicina	15 / 15 (100)	00 / 15 (0,0)	00 / 15 (0,0)
Enrofloxacina	10 / 15 (66,7)	05 / 15 (33,3)	00 / 15 (0,0)
Cefaclor	14 / 15 (93,4)	00 / 15 (0,0)	01 / 15 (6,6)
Ciprofloxacina	15 / 15 (100)	00 / 15 (0,0)	00 / 15 (0,0)
Ampicilina	15 / 15 (100)	00 / 15 (0,0)	00 / 15 (0,0)
Tetraciclina	09 / 15 (60)	00 / 15 (0,0)	06 / 15 (40)

* Número de amostras sensíveis sobre o número total de SE testadas.

** Número de amostras intermediárias sobre o número total de SE testadas.

*** Número de amostras resistentes sobre o número total de SE testadas.

De acordo com Gellin et al. (1989), o uso indevido de drogas antimicrobianas em animais resulta no aumento da pressão seletiva para linhagens bacterianas multiresistentes da microbiota normal. Entretanto, poucos estudos mostraram a relação direta entre a exposição aos antimicrobianos e a presença de bactérias resistentes nos animais, devido à limitação de distinguir claramente entre os animais expostos e não expostos aos fármacos.

O interesse pela utilização de antimicrobianos na alimentação dos animais baseia-se no aumento no ganho de peso, melhora da conversão alimentar e redução da mortalidade. Esse emprego é frequentemente referido como subterapêutico porque a quantidade utilizada é inferior àquela usada no tratamento de doenças específicas (YOUNG, 1994). Contrariamente, Nonboe (1999) relata que na Europa o uso de antimicrobianos como aditivos na alimentação animal foi proibido desde 1999, com a justificativa do possível aumento na ocorrência de microrganismos multiresistentes no homem.

Os países que tem restrições ao uso dos promotores de crescimento tornaram-se mais eficientes no manejo de primeira linha, incluindo sistema tudo dentro/tudo fora, excelente limpeza, desinfecção, nutrição balanceada, conforto ambiental e redução dos fatores que diminuem a imunidade dos animais, principalmente no caso dos mais jovens. Também recorrem a produtos alternativos como minerais, probióticos, prebióticos, imunostimulantes, enzimas, acidificantes e extratos de plantas medicinais (JORGE NETO e DARI, 2000).

O uso indiscriminado e inadequado de antibióticos, tanto em homens quanto em animais, tem emergido como problema em saúde em diversos países, já que a pressão seletiva destes fármacos sobre bactérias patogênicas em animais também influencia o perfil de sensibilidade de bactérias virulentas ao homem, por troca de plasmídeos, principal mecanismo de resistência bacteriana (ALECRIM et al., 2002).

Lactobacillus reuteri e *L. salivarius* apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* às amostras de SE nos métodos de antagonismo “spot on the lawn” e antagonismo simultâneo de difusão em poços. O antagonismo foi detectado pela presença de zonas de inibição formadas ao redor das culturas e mensuradas em milímetro (mm), variando entre 12 a 24 mm de diâmetro, conforme se

ilustra nas Figuras 1 e 2. Todas as 15 amostras de SE revelaram sensibilidade frente a *L. salivarius* pelo método de antagonismo “spot on the lawn”, com zonas de inibição que variaram de 16 a 24mm. Treze amostras (86,7%) de SE foram sensíveis à ação das substâncias antagonicas produzidas pelo *L. reuteri* formando zonas de inibição que variaram de 14 a 22mm e duas resistentes (13,3%).

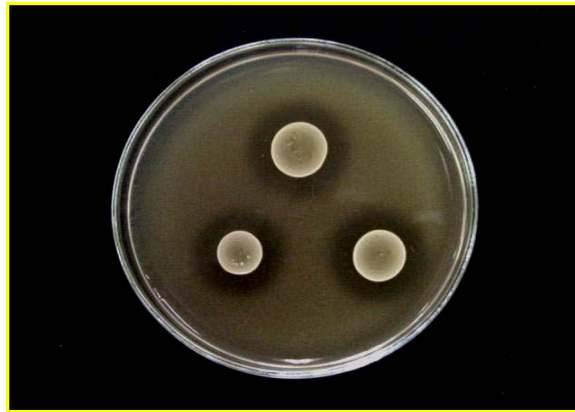


FIGURA 1. Ação antagonica de *Lactobacillus salivarius* frente a *Salmonella* Enteritidis pelo método de antagonismo “spot on the lawn”.

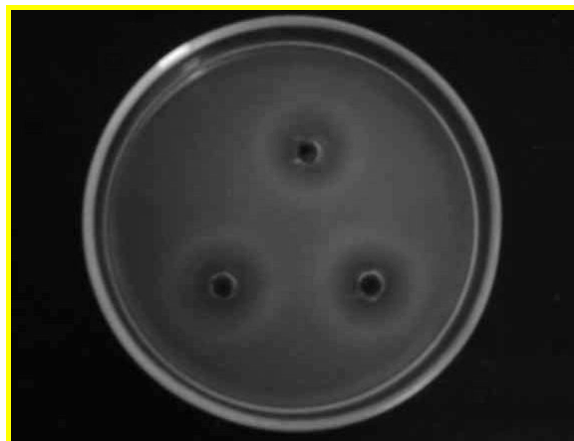


FIGURA 2. Ação antagonica de *Lactobacillus reuteri* frente a *Salmonella* Enteritidis pelo método de antagonismo simultâneo de difusão em poços.

No método de antagonismo simultâneo de difusão em poços utilizando SE frente às espécies de *L. reuteri* e *L. salivarius*, verificou-se ação antagonica característica de substância de natureza protéica (bacteriocina), observadas pelas zonas de inibição ao redor dos poços. O índice de sensibilidade de SE frente a *L. reuteri* foi de 46,7% (7 amostras) e 33,4% para *L. salivarius* (5 amostras), com zonas de inibição variando de 13 a 15mm. A resistência foi de 53,3% (8 amostras) e 66,6% (10 amostras).

Determinadas espécies de *Lactobacillus* utilizadas como probióticos produzem grande variedade de substâncias antimicrobianas (MICHAEL et al., 1997), principalmente de origem protéica denominadas bacteriocinas. A eficácia e espectro de ação das bactérias ácido lácticas contra microrganismos patogênicos são baseados na ação de bacteriocinas e/ou na combinação de substâncias antagonicas como peróxido de hidrogênio, ácidos orgânicos e bacteriófagos (GILLILAND e SPECK, 1972). Lima et al. (2007) demonstraram pelos métodos de antagonismo “spot on the lawn” e Lima, E.T. et al. Perfil de sensibilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isolada de aves, frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*. *Vet. e Zootec.*, p.180-189, v.16, n.1, mar., 2009.

antagonismo simultâneo de difusão em poços que amostras de *L. reuteri*, *L. salivarius* e *Lactobacillus* spp. apresentaram ação antagonística característica de bacteriocinas frente a *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.

Servin e Coconier (2003) descreveram que as bactérias lácticas apresentam efeito inibitório sobre a multiplicação e a produção de toxinas de outras bactérias. Pereira et al. (2004) investigaram o potencial probiótico de *Lactobacillus plantarum* e *L. fermentum* e verificaram inibição de *Escherichia coli* (EPEC e ETEC), creditado à ação de bacteriocinas, cujas culturas probióticas se mantiveram em pH constante, eliminando o efeito de acidificação do meio devido à produção de ácidos.

Os métodos de antagonismo “spot on the lawn” e antagonismo simultâneo de difusão em poços utilizados no presente estudo foram efetivos na sensibilidade do microrganismo indicador (SE), porém o tamanho do halo de inibição bacteriano variou de acordo com o método. Resultados similares foram observados por Rosa (1998) e Lima et al. (2007) utilizando os mesmos métodos de antagonismo, que verificaram ação antagonística produzida por *Lactobacillus* frente a diferentes microrganismos indicadores, aferida pela variação nos diâmetros dos halos de inibição. A atividade das bacteriocinas pode ser estimada a partir do tamanho das zonas de inibição produzidas nos testes de difusão (MONTVILLE e WINKOWSKI, 1997).

Os produtos da PCR das amostras de SE foram amplificados usando os oligonucleotídeos dirigidos para a seqüência do gene de resistência antimicrobiana (*integron* classe 1). Entretanto, nenhuma banda em gel de agarose correspondente a amplificação do segmento genômico de interesse foi observada no presente estudo.

Uma das maiores preocupações quanto ao uso de antimicrobianos é a seleção de microrganismos multiresistentes, limitando a eficiência terapêutica e aumentando os custos de tratamento (NOGUEIRA et al., 2005). A resistência antimicrobiana é mediada por *integron* que ocorrem nos plasmídeos. Com efeito, espécies de bactérias patogênicas presentes no trato intestinal são freqüentemente expostas a vários antimicrobianos, favorecendo os riscos de disseminação de genes de resistência aos fármacos (GOLDSTEIN, 2001).

CONCLUSÕES

Todas as amostras de SE apresentaram amplo perfil de sensibilidade à maioria dos antimicrobianos testados.

As amostras de *L. reuteri* e *L. salivarius* apresentaram antagonismo contra SE, indicando a ação de substâncias de natureza protéica (bacteriocina).

Não houve relação direta entre a presença do gene de resistência antimicrobiana (*integron* classe 1) e a resistência das amostras de SE frente às drogas antimicrobianas.

REFERÊNCIAS

ALECRIM, W.D.; LOUREIRO, A.C.S.P.; MORAES, R.S. Febre tifóide: recaída por resistência antimicrobiana. Relato de caso. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.35, p.661-663, 2002.

ÁLVAREZ, F.M.; RODRÍGUES, S.T.; BREY, F.E.; LÓPEZ, M.C.; PIÑEIRO, L. Asociación entre integrones de clase 1 com resistência a múltiples antimicrobianos y plásmidos conjugativos en *Enterobacteriaceae*. **Rev. Esp. Quimioter.**, v.16, p.394-397, 2003.

AMABILE-CUEVAS, C. F.; CHICUREL, M. E. Bacterial plasmids and gene flux. **Cell.**, v.70, p.189-199, 1992.

ANDREATTI FILHO, R.L.; FERNANDES, S.A.; BORETTI, L.P.; BARROS, M.R.; DEL BEM, S.R.; FONTANA, A.; SAMPAIO, H.M.; SAVANO, E.N. Sorovares de *Salmonella* isolados de amteriais avícolas no período de 1994 a 1999. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP.**, v.4, p.90-101, 2001.

ANDREATTI FILHO, R.L. Paratifo aviário. In: ANDREATTI FILHO, R.L. (Ed.). **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007. p.96-111.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant

Lima, E.T. et al. Perfil de sensibilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isolada de aves, frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*. **Vet. e Zootec.**, p.180-189, v.16, n.1, mar., 2009.

plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v.7. p.1513-1523, 1979.

BRUNO, M.E.C.; MONTVILLE, T.J. Common mechanistic action of bacteriocin from lactic acid bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 59, p.3003-3010, 1993.

CENTER FOR DISEASES CONTROL. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis-g.htm>>. Acesso em: 04 ago. 2007.

CLSI/NCCLS 2003. **Padronização dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão.** Disponível em:< http://www.sbmicrobiologia.org.br/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 26 set. 2007.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. **Council regulation on the authorisation of the additive avilamycin in feedingstuffs.** Disponível em: <<http://www.register.consilium.eu.int/pdf/en/03/st06/st06120en03.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2006.

FRETER, R.; STAUFFER, E.; CLEVEN, D.; HOLDEMAN, L.V.; MOORE, E.C. Continuous-flow cultures as in vitro models of the ecology of large intestinal flora. **Infect. Immun.**, v.39, p.666-675, 1983.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, v.66, p.365-78, 1989.

FURLAN, R.L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B.C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: SIMPÓSIO TÉCNICO DE INCUBAÇÃO, MATRIZES DE CORTE E NUTRIÇÃO, 2004, Camboriú. **Anais...** Camboriú, 2004. p.6-28.

GELLIN, G.; LANGLOIS, B.E.; DAWSON, K.A. Antibiotic resistance of gram-negative enteric bacteria from pigs in three herds with different histories of antibiotic exposure. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.55, p.2287-2292, 1989.

GILLILAND, S.E.; SPECK, M.L. Interactions of food starter cultures and food borne pathogens: lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. **J. Milk Food Technol.**, v.35, p.307-310, 1972.

GOLDSTEIN, C.; LEE, M.D.; SANCHEZ, S.; HUDSON, C.; PHILLIPS, B.; REGISTER, B.; GRADY, M.; LIEBERT, C.; SUMMERS, A. O.; WHITE, D.G.; MAURER, J.J. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, p.723-726, 2001.

GUTIÉRREZ, C.L.; MONTIEL, V.E.; AGUILERA, P.P.; GONZÁLEZ, A.M.C. Serotipos de *Salmonella* identificados en los servicios de salud de México. **Salud Pública Méx.**, v.42, p.490-495, 2000.

HARRIS, L.J.; DAESCHEYL, M.A.; STILES.; KLAENHAMMER. T.R. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v.52, p.384-887, 1989.

JAY, J.M. **Modern food microbiology.** 6.ed. Maryland: Aspen, 2000. p.679.

JORGE NETO, G.; DARI, R.L. Produtos químicos alternativos para promotores de crescimento. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2., 2000, Campinas. **Anais...** Campinas: FACTA, 2000. p217-239.

KLAENHAMMER, T.R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v.70, p.337-349, 1988.

LEWUS, C.B.; MONTVILLE, T.J. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **J.**

Lima, E.T. *et al.* Perfil de sensibilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isolada de aves, frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*. **Vet. e Zootec.**, p.180-189, v.16, n.1, mar., 2009.

Microbiol. Methods, v.13, p.145-150, 1991.

LIMA, E.T.; ANDREATTI FILHO, R.L.; OKAMOTO, A.S.; NOUJAIM, J.C.; BARROS, M.R.; CROCCI, A.J. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Can. J. Vet. Res.**, v.71, p.103-107, 2007.

MICHAEL, S.; WEI, S. Mack Dr.: *Escherichia coli* strain 2348/69 in vitro adhesion is reduced in the presence of a *Lactobacillus* species. **Gastroenterology**, v.112 A, p.1042, 1997.

MONTVILLE, T.J.; WINKOWSKI, K. Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. **Food microbial**. Washington: Fundamentals and Fortified ASM PRESS, 1997. p.557-577.

MROZ, Z. Substitutes for conventional growth promoters in poultry nutrition. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 40., 2003, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003. p.11-17.

NOGUEIRA, I.A.; BRASIL, P.; CONCEIÇÃO, M.; MARTINS, I.S. **Recomendações para o uso adequado dos antimicrobianos**. Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.saude.rj.gov.br/cecih/Antimicrobianos.doc>>. Acesso em: 16 dez. 2005.

NONBOE, U. Alternatives to the use of antibiotic growth promoters in farm animal. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 4., 1999, São Paulo. **Anais...** São Paulo, 1999. p.46-47.

PALERMO NETO, J. A questão dos resíduos de antimicrobianos em alimentos – Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária - CFMV ano 07 n.22 – 2001. Disponível em: <<http://www.cfmv.org.br/rev22/rev22>>. Acesso em: 04 ago. 2007.

PEREIRA, C.A.S.; LUCHESE, R.H.; VALADÃO, R.C. Potencial probiótico de linhagens de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum*. **Alimentaria**, p.54-59, 2004.

POPOFF, MY.; LE MINOR, L. **Formules antigeniques des serovars de Salmonella**. Centre Collaborateur OMS de reference et de recherche pour les *Salmonella*, 1992. p.145.

ROSA, M.C. Caracterização de uma bacteriocina produzida por uma cepa de *Lactobacillus sake* isolada de produtos cárneos. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5., 1998, Águas de Lindóia. **Resumo...** São Paulo: ICMSF, 1998. res.A.8.1.

SALYERS, A.A.; SHOEMAKER, N.B.; LI, L.Y.; STEVENS, A.M. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. **Microbiol. Rev.**, v.59, p.579-590, 1995.

SERVIN, A.L.; COCONIER, M. Adhesion of probiotic strain to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. **Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.**, v.17, p.741-754, 2003.

SILVA, M.F.; VAZ-MOREIRA, I.; GONZALEZ-PAJUELO, M.; NUNES, O.C.; MANAIA, C.M. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.1, p.1-11, 2006.

STOKES, H.W.; HALL, R.M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Mol. Microbiol.**, v.3, p.1669-1683, 1989.

TAGG, J.R.; DAJANI, A.S.; WANNAMAKER, L.W. Bacteriocins of gram positive bacteria. **Bacteriol. Rev.**, v.40, p.722-756, 1976.

Lima, E.T. *et al.* Perfil de sensibilidade de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isolada de aves, frente a drogas e substâncias antimicrobianas produzidas por *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*. **Vet. e Zootec.**, p.180-189, v.16, n.1, mar., 2009.

YOUNG, H.K. Do nonclinical uses of antibiotics make a different. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.15, p.484-487, 1994.

Recebido em: 05/08/2008

Aceito em: 26/11/2008