

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Salmonella*
enterica SUBSP. *enterica* SOROVAR Enteritidis NO RIO GRANDE DO SUL

Clarissa Silveira Luiz Vaz

PORTO ALEGRE, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Salmonella*
enterica SUBSP. *enterica* SOROVAR Enteritidis NO RIO GRANDE DO SUL

Autor: Clarissa Silveira Luiz Vaz

Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Microbiologia
Veterinária, especialidade Bacteriologia.

Orientador: Cláudio Wageck Canal

Co-orientadora: Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso

PORTO ALEGRE

2007

Clarissa Silveira Luiz Vaz

DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Salmonella enterica* SUBSP. *enterica* SOROVAR Enteritidis NO RIO GRANDE DO SUL

Aprovada em 28 FEV 2007.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Cláudio Wageck Canal
Orientador e Presidente da Comissão

Profa. Dra. Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso
Co-orientadora

Prof. Dr. Ângelo Berchieri Junior
Membro da Comissão

Profa. Dra. Gertrudes Corção
Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo César Tondo
Membro da Comissão

Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Cláudio Canal pela orientação deste trabalho, pela confiança depositada em mim durante todo o período do doutorado, pela amizade, pelo seu empenho na conclusão desta etapa, e pelo incentivo ao meu progresso profissional.

À Profa. Marisa Cardoso, a quem respeito e admiro muito e que me direcionou ao trabalho com o Prof. Canal, pela co-orientação deste trabalho, pelas preciosas sugestões nos experimentos e nos artigos científicos, e pela oportunidade de aprendizado junto ao seu grupo de pesquisa.

À Profa. Ana Paula Ravazzolo, pela amizade, convivência e gentil disponibilização de seu laboratório para execução de parte deste trabalho.

Ao Prof. Laerte Ferreira, pela sua amizade e apoio incondicional ao Laboratório de Virologia.

Ao Prof. Rui Lopes e ao Luis Paulo pela gentil disponibilização do espectrofotômetro.

Às secretárias do PPGCV, Maria, Vera e Joci, pela atenção dispensada.

Ao CNPq, cujos recursos financeiros fornecidos na forma de bolsa de estudo e taxa de bancada possibilitaram o custeio de parte dos experimentos e permitiram que este trabalho fosse realizado com dedicação integral.

A todos os professores e colegas do Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, pela amizade e paciência em dividir o espaço durante a condução de parte deste trabalho em seu laboratório; principalmente à Lisandra, Patrícia, Alessandra, Carina e Luciane, com quem convivi mais próximo, e que nunca pouparam esforços em auxiliar em tudo o que fosse necessário.

À Sílvia, pela pelo auxílio dispensado sempre quando solicitada.

À Eliana, pela amizade, companheirismo e apoio nas atividades realizadas no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular.

À Edna, pela amizade, carinho e por sempre iluminar a todos com a sua presença.

À Marjo, exemplo de persistência e profissionalismo, pela grande amizade e pelo auxílio técnico em diversos momentos, o qual permitiu contornar muitas dificuldades práticas.

À Cátia, amiga querida, que, embora distante de Porto Alegre, sempre manteve-se presente, enviando apoio e estímulo em todos os momentos.

Aos amigos Christopher, Carlos, Deise, Rúbia, Adri, Cristiano, Camila, Guilherme, e Silvia que, embora trabalhando em outros locais, mantiveram viva a amizade iniciada no Mestrado.

À Orema, presença querida em todos os dias no laboratório, por sempre trazer um abraço carinhoso, pela disposição em auxiliar no que estivesse a seu alcance e pela torcida por todos nós, que passamos pelo Laboratório de Virologia.

Ao André, que está iniciando uma carreira promissora na pesquisa, pela amizade, pelo auxílio técnico, pelo empenho na conclusão deste trabalho e por acreditar em mim mais do que eu mesma em muitos momentos.

À Josi, Laura, Carla, Marisa, Bira, Cris, Fabrício, Simone, Nanda, Laurício, Carine, Márcia, Nilzane, Flávio e Carlos André, profissionais exemplares, pessoas especiais e amigos queridos para o resto da vida; companheiros de muitos churrascos, almoços no RU, “Chacrinhas” (pausas para o café) e “Cavanhas” (reuniões para comer sanduíches), que, com suas presenças e seus conhecimentos, ajudaram a superar as dificuldades surgidas no Doutorado, fazendo do Laboratório de Virologia um maravilhoso local de trabalho e tornando inesquecível o período em que convivemos.

À Clara, ao Hamilton e ao Igor, meus exemplos de perseverança, pelo amor incondicional e essencial demonstrado em todos os momentos da minha vida, pelo incentivo ao meu aprimoramento pessoal e profissional, pela torcida e por acreditarem em mim.

Ao Hermides, meu grande amor, companheiro e amigo, pela sabedoria transmitida no decorrer deste período, pelo auxílio técnico e científico em diversos momentos, e por fazer parte da minha vida.

RESUMO

Salmonella enterica sorovar (*S.*) Enteritidis é uma das principais bactérias envolvidas em surtos de infecção alimentar em humanos decorrentes do consumo de produtos de origem animal. Nas investigações epidemiológicas, a subtipificação fenotípica e genotípica permitem verificar diferenças ou similaridades entre linhagens, as quais podem indicar sua origem, auxiliando os programas de controle e prevenção do patógeno. No presente trabalho, foram analisados os padrões de resistência a antimicrobianos, fagotipificação, macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismo de comprimento do fragmento amplificado utilizando uma única enzima de restrição (SE-AFLP) de 107 linhagens de *S.* Enteritidis, sendo 53 isoladas de aves e seus produtos (carcaças, carne, vísceras e ambiente) e uma de origem suína. Foram ainda analisadas 29 linhagens isoladas de alimentos e 14 isoladas de humanos envolvidos em surtos de salmonelose notificados no Rio Grande do Sul, uma amostra de referência (ATCC 13076), além de 9 linhagens isoladas na Europa e África. Na comparação entre amostras isoladas de aves e de surtos de salmonelose, as linhagens de origem avícola foram significativamente mais resistentes a antimicrobianos do que as isoladas de humanos e, embora não tenha sido encontrada relação entre os genótipos de PFGE e os padrões de resistência, a associação de ambas as técnicas possibilitou uma melhor caracterização de *S.* Enteritidis, podendo ser úteis como marcadores epidemiológicos. Por outro lado, SE-AFLP agrupou a maioria das linhagens de *S.* Enteritidis num padrão principal. Paralelamente, na comparação de técnicas genotípicas com base em PCR, SE-AFLP apresentou maior capacidade de discriminação, embora inferior à verificada pela fagotipificação e perfil de resistência a antimicrobianos. Assim, foi recomendado que esta técnica deve ser utilizada em associação com outras metodologias na tipificação de *S.* Enteritidis. Posteriormente, na caracterização do conjunto de linhagens de *S.* Enteritidis, foram identificados 13 diferentes padrões de resistência a antimicrobianos, além de 12 padrões de PFGE e 3 de SE-AFLP. As técnicas genotípicas demonstraram que existe um genótipo predominante de *S.* Enteritidis no Rio Grande do Sul, o qual está presente em aves e produtos relacionados, além de alimentos e humanos envolvidos em surtos de salmonelose, sugerindo que estas linhagens possam derivar de uma fonte comum, tendo provável relação clonal. Embora havendo um genótipo predominante

de *S. Enteritidis*, a associação das técnicas propostas possibilitou a melhor caracterização do patógeno.

ABSTRACT

Salmonella enterica subsp. enterica (S.) serovar Enteritidis is one of the main pathogens involved in food-borne diseases worldwide. Subtyping is crucial to differentiate strains, as well to study its origin and major infection route, which can direct preventive and control measures in epidemiological investigations of food-related salmonellosis. In order to investigate phenotypic and genotypic characterization in S. Enteritidis, the aim of this study was analyze the antimicrobial resistance, phage types, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and single-enzyme amplified-fragment length polymorphism (SE-AFLP patterns of 107 S. Enteritidis strains isolated from poultry (53 isolates from carcass, meat, viscera and environmental swab) and one from swine. We also analyzed 29 strains from food and 14 from humans involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, one reference strain (ATCC 13076) and 9 strains isolated from African and European countries. Resistance rates found in poultry-related strains were significantly higher than that observed in strains isolated from humans. Since identical PFGE profiles were identified in antimicrobial resistant and susceptible strains, it was not possible to find relationship between the PFGE genotypes and the antimicrobial resistance patterns found. However, both approaches were able to improve S. Enteritidis characterization. On the other hand, SE-AFLP clustered most of the S. Enteritidis strains in a major pattern. In a comparison between based-PCR approaches, SE-AFLP showed a higher discriminatory power, although it was lower than that displayed by antimicrobial resistance and phage type patterns. Thus, SE-AFLP might be used associated to other approaches for S. Enteritidis characterization. In contrast, 13 different antimicrobial resistance patterns, 12 PFGE genotypes and 3 SE-AFLP genotypes were identified in the S. Enteritidis strains. Genotypic approaches showed that the strains isolated from poultry, poultry-related products, food and humans involved in salmonellosis outbreaks shared a major pattern. These results suggest that the strains have a close relationship and the association of the different approaches improved S. Enteritidis characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigo 1

FIGURE 1- Macrorestriction patterns of *Salmonella* Enteritidis isolates obtained with *Xba*I (a). A dendrogram shows the relationships of the *S. Enteritidis Xba*I patterns (b).57

Artigo 2

FIGURE 1- SE-AFLP patterns of the *Salmonella* serovars obtained with primer HI-C. 81

FIGURE 2- SE-AFLP patterns of the *S. Enteritidis* strains analyzed. 82

Artigo 3

FIGURA 1- Visualização da eletroforese realizada em gel de agarose 1,5% dos produtos da SE-AFLP, com os perfis distintos obtidos com os iniciadores A (A1, A2, A3 e A4), T (T1 e T2), C (C1, C2, C3, C4 e C5) e G (G1, G2, G3 e G4). 103

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

TABLE 1- Antimicrobial resistance found in *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry, humans and food.....55

TABLE 2- Distribution of antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns from poultry, human and food *Salmonella* Enteritidis strains.56

Artigo 2

TABLE 1- Source, number of isolates tested, country of origin and SE-AFLP genotypes of the *Salmonella enterica* strains analyzed.....80

Artigo 3

TABELA 1- País e origem das amostras analisadas, juntamente com o fagotipo (PT), determinação da sensibilidade a antimicrobianos (DSA)*, perfil de REP, ERIC e BOX-PCR, presença de genes de virulência (*spvR* e *spvC*) e perfil obtido pelos diferentes iniciadores utilizados na técnica de SE-AFLP (A, C, G ou T)..... 102

Artigo 4

TABELA 1- Origem, número de linhagens analisadas, padrões de PFGE, SE-AFLP e resistência a antimicrobianos identificados em *S. Enteritidis*..... 116

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	grau Celsius
µg	micrograma
AFLP	<i>Amplified-fragment length polymorphism</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
pb	pares de bases
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	força gravitacional
kb	kilobase
LPS	lipopolissacarídeo
M	molar
mg	miligrama
MgCl ₂	cloreto de magnésio
mL	mililitro
mM	milimolar
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	potencial de hidrogênio
pmol	picomolar
PNSA	Plano Nacional de Sanidade Avícola
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
rep-PCR	<i>Repetitive-sequence polymerase chain reaction</i>
SDS	dodecilsulfato de sódio
SE-AFLP	<i>Single-enzyme amplified fragment length polymorfism</i>
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
U	unidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 A cadeia produtiva da avicultura	16
2.2 Salmoneloses	17
2.3 O gênero <i>Salmonella</i>	18
2.4 <i>Salmonella</i> Enteritidis	19
2.5 Vigilância epidemiológica	22
2.6 Fagotipificação	23
2.7 Resistência a antimicrobianos	25
2.8 Macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE)	27
2.9 Técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	28
2.10 Análise por SE-AFLP	30
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	32
3.1 Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns from poultry, human and food <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis isolated from Southern Brazil	32
3.2 Use of a modified AFLP protocol to discriminate <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis isolates	58
3.3 Análise do poder discriminatório da SE-AFLP para <i>Salmonella</i> Enteritidis frente a outras técnicas fenotípicas e genotípicas	83
3.4 Características genotípicas e fenotípicas de <i>Salmonella enterica</i> sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul	104
4. DISCUSSÃO	117
5. CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
ANEXOS	136
Anexo 1. Parecer favorável para publicação do artigo científico 3.2	
Anexo 2. Parecer favorável para publicação de artigo científico 3.3	

1. INTRODUÇÃO

Salmonella enterica constitui um dos principais grupos de bactérias envolvidos em surtos de infecções alimentares em consumidores em todo o mundo. Dos casos registrados, embora poucos resultem no óbito do paciente, vários requerem hospitalização e causam prejuízos econômicos pela perda de dias de trabalho. Enquanto a infecção por *Salmonella Typhi* está relacionada ao contato com fezes contaminadas de humanos portadores, nos quais causa a febre tifóide, a infecção de humanos por salmonelas paratíficas está relacionada ao consumo de alimentos contaminados, principalmente aqueles de origem avícola, suína e bovina.

Dentre as salmonelas paratíficas, *S. Enteritidis* vem recebendo destaque desde o início da década de 90, quando passou a ser registrado em diversos continentes um drástico aumento da incidência de infecções decorrentes do consumo de alimentos contaminados por este sorovar. O patógeno tem uma ampla gama de reservatórios animais, apresentando a habilidade de sobreviver e persistir no ambiente. No entanto, a associação dos surtos ao consumo de carne e ovos dirigiu a atenção das pesquisas à indústria avícola. *S. Enteritidis* adaptou-se com sucesso na avicultura comercial, onde provavelmente ocupou o nicho deixado pelos sorovares adaptados às aves (*S. Gallinarum* e *S. Pullorum*) os quais, antes da adoção de medidas de controle e prevenção, eram aqueles de maior importância na avicultura. Como, muitas vezes, a infecção das aves por *S. Enteritidis* ocorre sem a demonstração de sinais clínicos, a identificação do problema foi dificultada, permitindo sua disseminação, principalmente pela forma vertical.

A redução de salmonelas na indústria avícola passou a ser implantada com as medidas de prevenção e controle preconizadas no Plano Nacional de Sanidade Avícola. Contudo, a avicultura funciona num sistema amplo e complexo, o qual apresenta características próprias, que podem representar pontos críticos para a introdução de *S. Enteritidis*. Com o sistema de integração, linhagens do patógeno podem ser disseminadas, levando a um estado de contaminação persistente que é difícil eliminar. Atualmente, a transmissão vertical tem sido reduzida, aumentando, portanto, a importância da transmissão horizontal. Aves contaminadas na granja podem introduzir o patógeno na linha de abate, contaminando

equipamentos e, subseqüentemente, o produto final. Condições inadequadas de limpeza e desinfecção destas instalações podem manter *S. Enteritidis* no ambiente, tornando difícil a sua eliminação.

A indústria avícola brasileira é altamente tecnificada e produtiva, ocupando uma importante posição econômica e social no país. O produto é destinado tanto ao mercado interno quanto ao externo, sendo o Brasil um dos maiores produtores e exportadores de carne de frango. Tanto o consumidor externo quanto o interno vêm demonstrando crescente preocupação com a segurança dos alimentos, gerando demanda por produtos de origem animal com comprovada qualidade sanitária. Deve-se considerar que a presença de salmonelas torna qualquer produto alimentar impróprio para o consumo humano, determinando sua condenação. Portanto, a indústria avícola brasileira precisa controlar a ocorrência de salmonelas na cadeia produtiva, tanto para oferecer um produto inócuo ao consumidor, quanto para contornar as barreiras comerciais à exportação de seu produto.

A redução do nível de contaminação das carcaças na indústria envolve a identificação das fontes de contaminação, visando controlar o patógeno em todos os estágios de produção. Além disso, na investigação epidemiológica de surtos de salmonelose é necessário rastrear a trajetória do patógeno até sua origem. Para o sucesso dos programas de controle de *Salmonella*, além da rápida e precisa detecção, é necessário conhecer a origem de sua introdução na cadeia produtiva. Isso pode ser obtido com a caracterização das amostras detectadas, cuja similaridade ou diferença entre linhagens permite inferir fontes de contaminação, além de identificar reservatórios naturais. Neste sentido, a utilização de técnicas de caracterização fenotípicas e genotípicas permite traçar a mobilidade de *S. Enteritidis* numa população e entre diferentes espécies. Esta caracterização gera, portanto, um melhor entendimento da sua epidemiologia.

Técnicas fenotípicas, como a fagotipificação e a sensibilidade a antimicrobianos são métodos amplamente utilizados para este propósito. Entretanto, as técnicas fenotípicas são limitadas pela possibilidade de alteração da expressão gênica ou diante da dominância de determinados sorovares e fagotipos, o que é freqüente em *S. Enteritidis* e é influenciado pelo caráter clonal do patógeno. Técnicas moleculares são utilizadas como auxiliares na caracterização mais detalhada de isolados cuja necessidade de discriminação seja mais elevada. Dentre estas, a macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado

(*Pulsed-field gel electrophoresis*, PFGE) é considerada a metodologia de referência para tipificação molecular, em razão da reprodutibilidade dos resultados. Todavia, a associação de diferentes técnicas de tipificação molecular aumenta a capacidade de discriminar as linhagens, uma vez que detectam polimorfismos em diferentes regiões do genoma do microrganismo. A utilização de técnicas de tipificação baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) possibilita a geração de resultados precisos, sendo de execução menos laboriosa e de custo financeiro mais baixo, facilitando sua implementação em laboratórios de médio porte. Entre estas, o Polimorfismo de comprimento do fragmento amplificado (*Amplified-fragment length polymorphism*, AFLP) vem apresentando resultados reprodutíveis entre laboratórios quando na investigação de diferentes patógenos, dentre os quais, *S. Enteritidis*.

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo estudos que buscam determinar a situação atual de *Salmonella* sp. na cadeia produtiva avícola e suinícola, bem como adequar os métodos de diagnóstico através da otimização de sua identificação por técnicas moleculares. Os primeiros trabalhos tiveram o objetivo de otimizar a detecção de *Salmonella* em suínos e em aves, através do isolamento microbiológico tradicional do patógeno e por PCR. Sendo verificada a prevalência do patógeno nas indústrias, foi verificado que os animais portadores representam uma potencial fonte de contaminação para outros animais e para o produto final. Como continuidade desta linha, iniciamos um trabalho que buscou aplicar técnicas preconizadas por grupos de referência no estudo da epidemiologia desse patógeno para a caracterização fenotípica e molecular de *S. Enteritidis* de origem suína e aviária. Buscou-se, assim, caracterizar e comparar as linhagens obtidas de produtos alimentares de origem animal com as isoladas de surtos em humanos, o que trará subsídios para o rastreamento do patógeno dentro da cadeia, possibilitando ainda a investigação e prevenção de surtos. Desta forma, espera-se que as técnicas estabelecidas possam auxiliar na tomada de decisões sobre as medidas de controle do patógeno na cadeia produtiva avícola.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar linhagens de *S. Enteritidis* quanto à sua diversidade fenotípica e genotípica, através de diferentes metodologias de caracterização: fagotipificação, resistência a antimicrobianos, PFGE e SE-AFLP. Essas metodologias foram avaliadas quanto à capacidade de discriminação, determinando sua

utilidade em programas de controle e vigilância do patógeno na cadeia produtiva. Num primeiro estudo, foram analisados os perfis de PFGE e de resistência a antimicrobianos em linhagens isoladas de aves e de alimentos e pacientes envolvidos em surtos de salmonelose com o objetivo de verificar o significado dos produtos avícolas como fonte de infecção para os consumidores. Posteriormente, foi avaliado um método de genotipificação alternativo a PFGE, baseado no princípio de AFLP (SE-AFLP) para a tipificação de *S. Enteritidis*. Uma vez padronizado, SE-AFLP foi utilizado, ainda, na caracterização de linhagens com diferentes origens, sendo o resultado comparado a outros métodos de tipificação. Finalmente, um quarto estudo comparou os resultados preliminares obtidos na análise de *S. Enteritidis* com as técnicas propostas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cadeia produtiva da avicultura

A indústria avícola brasileira está entre as mais produtivas do setor, tornando o país o segundo produtor de carne de frango e o maior exportador do produto (UBA, 2006). Com a recessão no setor, desencadeada pelo surgimento de casos de Influenza Aviária em aves e em humanos na Ásia, África e Europa, houve intensa retração do mercado, o qual, contudo, demonstrou início de recuperação a partir do segundo semestre de 2006. No mercado externo, o Brasil é beneficiado pelas condições sanitárias adversas presentes nos plantéis de seus principais concorrentes (ABEF, 2006). A participação brasileira no mercado internacional de carne de frango já responde por 41% do volume do produto (UBA, 2006). A avicultura tem sua importância consolidada na economia brasileira, cujo volume de exportações no ano de 2005 foi apenas inferior à exportação de soja.

O mercado interno é o principal destino do produto. Em 2005 foram produzidos 9,297 milhões de toneladas de carne de frango, dos quais 70% foram consumidos no mercado doméstico (ABEF, 2006). A tecnificação da indústria avícola permite que seus principais produtos, carne e ovos, sejam disponibilizados à população a custos acessíveis. No ano de 2005, o consumo de carne de frango foi de 35,5 quilos *per capita* (UBA, 2006). No âmbito social, a indústria opera em sistema de integração que, em grande parte, utiliza mão-de-obra tipicamente familiar. É, portanto, um segmento que gera renda e estimula a fixação do homem ao campo.

Ainda que a adaptação da indústria avícola ao país tenha sido favorecida pelas condições climáticas e produção suficiente de grãos, seu crescimento foi também resultado do maciço investimento em tecnologia, tornando-a altamente produtiva e, conseqüentemente, competitiva dentro do mercado mundial. Tanto a manutenção quanto o crescimento dessa condição depende, em grande parte, de parâmetros sanitários, de modo a garantir um produto com características higiênicas e sanitárias adequadas, uma exigência cada vez maior por parte do mercado consumidor. A indústria deve, portanto, resguardar-se de potenciais fatores que possam representar barreiras para a exportação do produto e risco ao consumidor.

2.2 Salmoneloses

Nos Estados Unidos, as doenças transmitidas por alimentos acometem anualmente cerca de 76 milhões de pessoas, das quais 350 mil são hospitalizadas (ROCCOURT et al., 2003). O gênero *Salmonella* é um dos principais grupos de bactérias envolvidos em surtos de infecções alimentares em consumidores de todo o mundo. Somente nos Estados Unidos, estima-se que, a cada ano, ocorram 1,4 milhões de casos de salmonelose (VOETSCH et al., 2004), ocasionando prejuízos econômicos pela hospitalização e perda de dias de trabalho. A salmonelose é a doença transmitida por alimentos mais frequentemente notificada no Rio Grande do Sul desde 1993 (NADVORNY et al., 2004). Dos casos de doenças transmitidas por alimentos relatados no Rio Grande do Sul entre 1997 e 1999, *Salmonella* sp. foi identificada como causa de 35,7% dos surtos, nos quais 2846 consumidores foram acometidos e ocorreram 1557 hospitalizações (COSTALUNGA & TONDO, 2002).

A maioria dos surtos tem sido associada ao consumo de ovos ou derivados crus ou mal-cozidos. Também a carne de frango, contaminada de forma cruzada ou submetida a tratamento térmico inadequado tem sido implicada em casos de salmonelose (COSTALUNGA & TONDO, 2002; PATRICK et al., 2004; KIMURA et al., 2004; GILLESPIE et al., 2005).

Um estudo epidemiológico dos surtos de salmonelose notificados no Estado de São Paulo, entre o período de 1993 a 1997, demonstrou que todos estavam relacionados ao consumo de alimentos contaminados de origem avícola, sendo a maioria devido à utilização de ovos crus. Foi ainda evidenciada a alta capacidade de disseminação do patógeno através da contaminação cruzada durante o preparo de alimentos (PERESI et al., 1998). Casos notificados na Inglaterra também associam os surtos ao tratamento térmico inadequado do alimento e, também, à contaminação cruzada (GILLESPIE et al., 2005). No Rio Grande do Sul, de acordo com dados da Divisão de Vigilância Sanitária Estadual, *Salmonella* sp. foi o microrganismo mais associado aos surtos de infecções alimentares (COSTALUNGA & TONDO, 2002).

Contudo, sabe-se que uma parcela muito pequena dos casos é notificada aos órgãos oficiais. Por este motivo, estima-se que o número de surtos relacionados a *Salmonella* sp. seja ainda maior. A alta incidência de infecções alimentares causadas pelo consumo de

produtos de origem aviária contribuiu para associar o gênero *Salmonella* a este tipo de alimento no imaginário do consumidor.

Tanto o consumidor interno quanto o mercado importador de alimentos vêm demonstrando crescente preocupação com a inocuidade dos produtos, gerando demanda por produtos de origem animal com qualidade sanitária comprovada (BLAHA, 2001). No que diz respeito à comercialização da carne, a *Salmonella* é relevante, já que sua presença torna o alimento impróprio ao consumo humano, motivo pelo qual o produto é condenado (FORSYTHE, 2002). Portanto, a indústria avícola exportadora precisa controlar as infecções por esse patógeno para contornar as barreiras comerciais a seus produtos. Diante desta situação, o patógeno foi incluído no Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) desde sua implantação em 1994, o qual prevê medidas que visam o controle da *Salmonella* na indústria avícola.

No entanto, alguns fatores são considerados críticos na manutenção do patógeno ao longo da cadeia produtiva. A manutenção de lotes de reprodutoras positivas e aproveitamento de seus ovos para incubação, uso de antimicrobianos que minimizam as perdas produtivas e mascaram a infecção por *Salmonella*, além de contaminações cruzadas nos frigoríficos, onde a mistura de lotes de aves livres e infectados possibilita a distribuição do patógeno em diferentes pontos dos abatedouros, causando a contaminação do produto final. Medidas inadequadas de limpeza e desinfecção da linha de abate também contribuem para a manutenção da presença do patógeno nos frigoríficos (BERCHIERI JUNIOR et al., 1987; SILVA & DUARTE, 2002; CORRY et al., 2002; HEYNDRICKX et al., 2002; OLSEN et al., 2003). Por esta razão, a eliminação total de *Salmonella* é difícil e surtos de infecções alimentares causadas pelo consumo do produto contaminado são ainda notificados no Brasil (KAKU et al., 1995; PERESI et al., 1998).

2.3 O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* contém duas espécies, *enterica* e *bongori* (BRENNER et al., 2000). Mais recentemente foi proposta a inclusão de uma terceira espécie, *subterranea* (SHELOBOLINA et al., 2004). Por sua vez, *S. enterica* é dividida em seis subespécies, as quais apresentam diferenças bioquímicas e genômicas entre si. Com base na sorologia, a subespécie I (*enterica*) apresenta sorovares designados através da fórmula antigênica,

compreendendo os antígenos somático (O), flagelar (H) e capsular (Vi) (BRENNER et al., 2000). Como características gerais, apresentam-se como bastonetes curtos, gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbicos e facultativamente anaeróbicos. A maioria, exceto *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, é portadora de flagelos, que conferem mobilidade. Membros deste gênero possuem características comuns, como a utilização de citrato como única fonte de carbono, fermentação de glicídeos específicos e capacidade de multiplicação em ambiente aeróbico ou anaeróbico (DOYLE & CLIVER, 1990).

São conhecidos mais de 2400 sorovares de *Salmonella*, dos quais menos de 1% são adaptados a um hospedeiro específico (POPOFF et al., 2003). Cerca de 150 sorovares são considerados causadores de doenças em humanos. Os sorovares estão associados a doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados. Estes apresentam ampla diversidade de reservatórios animais e uma especial capacidade de sobrevivência em ambientes adversos, o que lhes confere um elevado potencial de disseminação.

Apesar desta diferente gama de hospedeiros, vários destes sorovares de *Salmonella enterica* têm relação muito próxima, já que apresentam cerca de 90% de similaridade em seu DNA. Contudo, cada sorovar apresenta regiões específicas de inserções ou elisões, distribuídas em várias partes do cromossomo, cujos produtos dos genes podem estar envolvidos na habilidade peculiar de cada sorovar em infectar uma variedade de hospedeiros (EDWARDS et al., 2002).

2.4 *Salmonella* Enteritidis

Dentre as salmonelas paratíficas, *S. Enteritidis* é, atualmente, responsável por significativos prejuízos à avicultura, tendo um caráter de zoonose com conseqüências importantes na saúde pública. Até 1980, o patógeno era isolado de humanos e animais em baixa freqüência em diferentes países (POPPE, 1999). A partir desta década, *S. Enteritidis* passou a ser o sorovar mais registrado na Europa, América do Norte e do Sul, Ásia e África, aumentando num percentual médio de 126% entre 1979 a 1987 (RODRIGUE et al., 1990). Já no início da década de 90, *S. Enteritidis* passou a ser mais isolada do que *S. Typhimurium*, até aquele período o sorovar mais envolvido em salmoneloses (GUARD-PETTER, 2001).

Mais recentemente verifica-se que esta pandemia continua em expansão, uma vez que *S. Enteritidis* responde por 60% de todos os sorovares envolvidos nos casos registrados pela Organização Mundial da Saúde (HERIKSTAD et al., 2002). As investigações epidemiológicas destes surtos indicam que, em sua grande maioria, os ovos foram o principal veículo do patógeno (COYLE et al., 1988; RODRIGUE et al., 1990; THRELFALL & CHART, 1993; GEIMBA et al., 2004; PATRICK et al., 2004; KIMURA et al., 2004; GILLESPIE et al., 2005).

De fato, as aves figuram entre os principais reservatórios do patógeno, sendo, portanto, importantes veículos de disseminação (DOYLE & CLIVER, 1990; OLSEN et al., 2001). Nos Estados Unidos o consumo de produtos avícolas, especialmente ovos crus ou mal cozidos, é ainda considerado a principal fonte de infecção por *S. Enteritidis* (OLSEN et al., 2001; KIMURA et al., 2004). Por outro lado, o incremento no consumo de carne de aves, incentivado pelo decréscimo do preço em relação a outros tipos de carne e a diminuição do consumo de carne bovina em países com registro de casos de encefalopatia espongiforme bovina, contribuiu para que a carne de aves seja também um fator de risco (OLSEN et al., 2001).

Segundo Gast & Beard (1993), as poedeiras infectadas por *S. Enteritidis* produzem ovos contaminados numa frequência muito baixa, e geralmente contendo um número muito pequeno de células. No entanto, a exposição do produto a temperaturas elevadas é um fator determinante para a multiplicação do patógeno. Deste modo, muitos dos casos de intoxicação alimentar ocorrem por contaminação cruzada durante o preparo de alimentos (KAKU et al., 1995). Pelas suas características funcionais, os abatedouros permanecem como um dos principais pontos de amplificação da presença de *Salmonella* sp. em carcaças de frango, onde uma carcaça positiva pode ser fonte de contaminação dos produtos do mesmo lote (HUMPHREY, 1999).

No Brasil, a ocorrência de *S. Enteritidis* é considerada alta em material de origem avícola (TAVECHIO et al., 1996; SOLARI et al., 1997; BAÚ et al., 2001; SILVA & DUARTE, 2002; KANASHIRO et al., 2005). Conseqüentemente, diversos surtos por *S. Enteritidis* registrados em humanos estão relacionados ao consumo de produtos da indústria avícola (KAKU et al., 1995; PERESI et al., 1998; GEIMBA et al., 2004).

Sugere-se que a emergência de *S. Enteritidis* tenha resultado das práticas atuais na avicultura comercial, essencialmente intensiva; associadas à redução da diversidade genética das linhagens de frangos. De fato, o sistema integrado de criação pode ter contribuído na disseminação do patógeno. Os prejuízos causados à avicultura pelas espécies adaptadas às aves, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, motivaram iniciativas de controle e erradicação destes sorovares nos países em que a indústria avícola é importante.

Uma hipótese lançada para explicar a pandemia de *S. Enteritidis*, observada desde então, seria o preenchimento do nicho ecológico deixado pelos sorovares *Pullorum* e *Gallinarum* (DOYLE & CLIVER, 1990; KINGSLEY & BÄUMLER, 2000; BÄUMLER et al., 2001). A adaptação de *S. Enteritidis* às aves pode estar ainda relacionada a uma maior capacidade de contaminação dos ovos em relação a outras salmonelas paratíficas. O patógeno demonstra maior afinidade por órgãos reprodutivos de poedeiras, o que pode facilitar sua colonização (de BUCK et al., 2004).

A associação de *S. Enteritidis* a ovos pode estar, portanto, relacionada a fatores que aumentem sua capacidade de sobrevivência ao ambiente, como alguns fatores de virulência. A presença de fímbria do tipo 1 está relacionada à aderência de *S. Enteritidis* ao epitélio do oviduto de poedeiras, bem como a sua ligação a substâncias secretadas pelas glândulas do istmo (de BUCK et al., 2004). Por conseguinte, a infecção dos órgãos reprodutivos leva à produção de ovos contaminados. Experimentalmente, variações na estrutura e na expressão dos lipopolissacarídeos entre diferentes linhagens de *S. Enteritidis* foram relacionadas à frequência de colonização do baço de aves (GAST & BEARD, 1993).

S. Enteritidis infecta as aves pela via oral, colonizando o trato intestinal. Aves infectadas e submetidas a condições extremas de estresse, como a prática da muda forçada, estão mais predispostas a eliminar o patógeno (RICKE, 2003). Aves que estão excretando o patógeno nas fezes podem contaminar a casca e, conseqüentemente, o ovo. Após a postura, ovos com cascas rachadas ou em contato com fezes contaminadas também estão sujeitos à contaminação. A transmissão de *S. Enteritidis* pode ocorrer também pela forma vertical, através da via transovariana. Neste caso, a contaminação dos ovos ocorre pela transmissão direta, através do ovário ou oviduto infectado (POPPE, 1999; de BUCK et al., 2004). De fato, a frequência de recuperação de *S. Enteritidis* de cascas de ovos é consideravelmente mais baixa do que da gema ou do albúmem, sugerindo que a penetração pela casca não é a

forma mais comum de contaminação (GAST & BEARD, 1993). Gama et al. (2003) detectaram *Salmonella* em caixas de transporte de pintos de um dia, sendo um forte indicativo da transmissão vertical.

Com o teste das aves para a presença de salmonelas e conseqüente eliminação dos ovos de matrizes positivas, previstos pelo PNSA, a transmissão horizontal passou a ter maior importância epidemiológica. Uma vez no ambiente, as principais fontes de contaminação são água de beber, ração, partículas de poeira, fômites, cama e o contato com outras espécies de aves ou mamíferos (BERCHIERI JUNIOR et al., 1989; POPPE, 1999). Particularmente, os roedores são altamente suscetíveis a *S. Enteritidis*, servindo como fonte de amplificação e excreção de um grande número de células nas fezes. Epidemiologicamente são os reservatórios mais importantes, sendo de difícil erradicação e capazes de introduzir o patógeno em granjas livres, persistindo mesmo após medidas de limpeza e desinfecção (GAST & BEARD, 1993; GUARD-PETER, 2001; RABSCH et al., 2001).

2.5 Vigilância epidemiológica

O controle de salmonelas envolve a criação de programas de controle sérios e eficazes. Pela complexidade da cadeia de fornecimento dos alimentos, devem ser adotados métodos que permitam o rastreamento do patógeno dentro da cadeia alimentar, possibilitando o retorno à sua origem, uma etapa essencial na investigação epidemiológica de surtos (O'BRIEN & de VALK, 2003; OLSEN et al., 2003). Portanto, o sucesso dos programas de controle está associado à vigilância epidemiológica, através da identificação de fontes de infecção e das rotas de transmissão.

As linhagens clonais de bactérias derivam de um ancestral comum e, por isso, compartilham características idênticas. Somente métodos muito sensíveis, e, geralmente, utilizados em associação, são capazes de identificar características menores, capazes de diferenciar microrganismos proximamente relacionados (clonais) dos não-relacionados (MENDOZA & LANDERAS, 1999). A tipificação de *S. Enteritidis* é uma das etapas necessárias ao estudo da manutenção de clones, bem como sua dispersão e evolução num determinado ambiente. Além disso, possibilita a diferenciação de linhagens mais patogênicas das menos patogênicas e a emergência de novas linhagens com importância na

avicultura e em saúde pública. Estas etapas são úteis na implantação de programas de vigilância epidemiológica e na adoção de medidas de controle (MANFREDA & de CESARE, 2005).

Com este objetivo, técnicas fenotípicas e genotípicas permitem traçar a mobilidade de *Salmonella* sp. dentro de uma população e entre diferentes espécies, caracterizando as linhagens, correlacionando-as à fonte de infecção e identificando os reservatórios naturais. Além disso, possibilitam detectar a transmissão cruzada do patógeno e diferenciar linhagens (MENDOZA & LANDERAS, 1999; OLIVE & BEAN, 1999; TSEN et al., 2002).

Os principais critérios na escolha de métodos para tipificação de *S. Enteritidis* incluem a capacidade do método em tipificar todas as linhagens analisadas, a reprodutibilidade do ensaio e o poder de discriminação (OLIVE & BEAN, 1999). Este último é particularmente importante na análise de bactérias clonais, como as pertencentes ao gênero *Salmonella*. Atualmente, o uso do índice de diversidade de Simpson (HUNTER & GASTON, 1988) para avaliação da capacidade de discriminação de técnicas de caracterização é muito difundido.

Neste contexto, foram criadas redes de investigação que objetivam otimizar a detecção de surtos de doenças transmitidas por alimentos, que incluem salmonelose, através de ensaios moleculares padronizados, de modo a subtipificar o patógeno de maneira mais reprodutível e confiável. Nos Estados Unidos, a rede PulseNet vem sendo utilizada na subtipificação de *Salmonella enterica*, servindo de modelo para a implantação de grupos similares no Canadá e em países da Ásia e da América do Sul (SWAMINATHAN et al., 2001). Na Europa, o projeto Salm-gene objetiva padronizar procedimentos laboratoriais para a tipificação molecular de *Salmonella*, padronizar a análise dos resultados, além de armazenar os principais perfis em circulação, os quais devem ser disponibilizados em bancos de dados *on-line*. Assim, espera-se oferecer condições para a análise contínua dos resultados, maximizando a detecção de surtos (PETERS et al., 2003).

2.6 Fagotipificação

Pelo caráter epidêmico de sua ocorrência, acredita-se que *S. Enteritidis* tenha surgido da expansão clonal de um único e mais virulento isolado, ainda que diferentes linhagens

tenham sido associadas em surtos na Europa e EUA (HELMUTH & SCHROETER, 1994; BÄULER et al., 2000). Destas linhagens, o fagotipo (PT) 4 de *S. Enteritidis* vem sendo o mais prevalente na Europa, enquanto que os PT 8 e 13a são os mais relatados nos Estados Unidos (THRELFALL & CHART, 1993; GUARD-PETTER, 2001; PATRICK et al., 2004; GILLESPIE et al., 2005). Na Região Sul do Brasil, o PT 4 é o mais prevalente (dos SANTOS et al., 2003), sendo sua disseminação em todo o país registrada a partir de 1993, após a importação de matrizes de países europeus (TAVECHIO et al., 1996).

O PT 4 está relacionado ao consumo de ovos crus ou mal cozidos (COYLE et al., 1988; GILLESPIE et al., 2005) e demonstra ser naturalmente patogênico, causando infecção tanto em poedeiras quanto em frangos de corte, nos quais demonstra ser bastante invasivo. Portanto, este fagotipo tem importância para a indústria avícola e também para a saúde pública (HUMPHREY, 1999). Mais recentemente, vem sendo registrado o declínio dos surtos causados por *S. Enteritidis* PT4, o que pode ser atribuído às medidas de controle adotadas na cadeia produtiva (GILLESPIE et al., 2005). Isso parece favorecer a introdução de outros fagotipos, uma vez que na Europa, a ocorrência do PT 4 vem diminuindo em favor da emergência de outros fagotipos, como o PT 1, o qual geralmente está associado à infecção de turistas durante viagens a países do Mediterrâneo (FISHER, 2004). Esta tem sido uma tendência nos países desenvolvidos que dispõem de redes de vigilância para salmoneloses, nos quais as infecções por *S. Enteritidis* foram, em sua maioria, relacionadas a viagens a países em desenvolvimento (KIMURA et al., 2004).

Stanley et al. (1991) identificaram três diferentes linhagens clonais de *S. Enteritidis*, das quais a mais homogênea reúne, entre outros, o PT 4 e PT 6, amplamente relatados. Evidencia-se, portanto, a existência de um precursor comum, e a conseqüente dificuldade na diferenciação de linhagens destes fenótipos. Populações caracteristicamente clonais de *S. Enteritidis*, evidenciadas pela dominância de fagotipos específicos em determinadas regiões geográficas, como o PT 4 no Brasil; tornam imprescindível a associação de técnicas de caracterização que sejam capazes de detectar diferenças menores entre os isolados. Frequentemente, apenas a associação de métodos moleculares de tipificação permite caracterizar essas amostras, devido a seu alto grau de uniformidade (MASLOW et al., 1993).

Sabe-se que a prevenção e o controle de salmoneloses dependem essencialmente do reconhecimento precoce dos surtos através de sistemas de vigilância baseados na subtipificação dos isolados. Com este objetivo, a fagotipificação é um dos principais métodos de tipificação de *S. Enteritidis*. Contudo, considerando a dominância de determinados fagotipos em muitos países, técnicas complementares, geralmente baseadas no genótipo, são utilizadas como auxiliares na caracterização de isolados cuja discriminação seja necessária (LIEBANA et al., 2001; OLSEN et al., 2003; PETERS et al., 2003).

Deve-se ainda considerar que uma parcela das linhagens de *S. Enteritidis* não é fagotipificável (LIEBANA et al., 2001). A instabilidade da fagotipificação é evidenciada também pela modificação do fagotipo devido à aquisição de plasmídeo ou pela modificação dos lipopolissacarídeos. Todavia, o principal motivo que torna a metodologia inadequada como único método na investigação epidemiológica é a alta frequência de *S. Enteritidis* envolvida em surtos ou casos esporádicos pertencente a um número restrito de fagotipos (CHASLUS-DANCLA & MILLEMANN, 1999; OLSEN et al., 2003).

2.7 Resistência a antimicrobianos

Além da utilidade como marcadores epidemiológicos fenotípicos, o perfil de resistência a antimicrobianos é uma ferramenta útil na identificação da emergência de linhagens resistentes. Bactérias resistentes podem ser selecionadas com o uso inadequado de antimicrobianos não só em animais, mas também em humanos (SCHWARZ et al., 2001). Com a pressão seletiva na produção animal, através do uso profilático, para promoção de crescimento e para tratamento de rebanhos em massa, pode haver estímulo da seleção de linhagens resistentes que podem ser transferidas por meio dos alimentos aos consumidores (MOLBAK, 2004).

De fato, os surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados sugerem a possibilidade de transmissão de eventuais linhagens resistentes a antimicrobianos pela cadeia alimentar. Como conseqüência, há um aumento de falhas no tratamento de pacientes e aumento da severidade das infecções (ANGULO et al., 2004). Durante muito tempo, as classes de antimicrobianos utilizados na prevenção ou no tratamento de infecções bacterianas em animais de produção eram as mesmas utilizadas na medicina humana

(SCHWARZ et al., 2001). Com isso, o uso de antimicrobianos na agricultura e na área veterinária vem sendo discutido e, desde então, algumas medidas vêm sendo adotadas para reduzir a emergência de linhagens resistentes (CAPRIOLI et al., 2000). A partir do ano de 2006 a União Européia passou a banir o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento animal. Por outro lado, é possível que a retirada de antimicrobianos da produção animal possa resultar apenas numa redução insignificante nas falhas de tratamentos dos pacientes (DAVIES, 2006).

Ao contrário de outros sorovares de *Salmonella enterica*, até recentemente *S. Enteritidis* permaneceu sensível a maioria dos antimicrobianos (CHASLUS-DANCLA & MILLEMANN, 1999; MOLBAK et al., 2002). Com a disseminação de *S. Enteritidis* na avicultura, os antimicrobianos passaram a ser utilizados de forma mais intensiva, visto que mascaram a infecção por esse patógeno (SILVA & DUARTE, 2002). Mais recentemente, vem sendo observado aumento da resistência a antimicrobianos, principalmente em relação às quinolonas, ao mesmo tempo em que vem sendo notada a diminuição da sensibilidade a a enrofloxacina na produção animal (ENDTZ et al., 1991; MALORNY et al., 1999).

Devido à complexidade das vias de transmissão de *Salmonella* sp. dos animais aos consumidores, é difícil atribuir o uso de antimicrobianos em animais de produção aos problemas de saúde em humanos (PHILLIPS et al., 2004). Um estudo que avaliou a incidência de resistência em *S. Enteritidis* em relação ao uso veterinário de antimicrobianos na Inglaterra e País de Gales demonstrou que o aumento do uso veterinário de tetraciclina teve impacto insignificante na ocorrência de resistência a esta droga. Ao mesmo tempo, o declínio registrado no uso de trimetoprim não refletiu redução da ocorrência de resistência a este antimicrobiano em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (THRELFALL et al., 2006).

Testes de sensibilidade a antimicrobianos compreendem ainda uma ferramenta útil na investigação epidemiológica, visto que a identificação de padrões de resistência novos ou incomuns geralmente é o primeiro indicativo de um surto. Contudo, a utilização da técnica isoladamente para estudos de epidemiologia tem valor limitado devido às variações fenotípicas e à pressão seletiva à qual o patógeno está exposto. A resistência a antimicrobianos geralmente decorre da aquisição de genes de virulência carregados por plasmídeos ou transposons, trocados entre linhagens da mesma espécie ou entre diferentes espécies. Na ausência de pressão seletiva, estes elementos podem ser perdidos. Assim,

linhagens diferentes podem desenvolver padrões de resistência semelhantes, ao mesmo tempo em que isolados pertencentes à mesma linhagem podem diferir no perfil de sensibilidade (ARBEIT, 2001).

2.8 Macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Em comum, as diversas redes de vigilância epidemiológica de *S. Enteritidis* utilizam a macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) para a caracterização das linhagens. PFGE é considerada a técnica padrão ouro para tipificação molecular, uma vez que os fragmentos resultantes são estáveis, de boa resolução e representam todo o genoma do microrganismo analisado (OLIVE & BEAN, 1999). Além disso, os resultados podem ser reproduzidos entre laboratórios (PETERS et al., 2003).

Embora linhagens de *S. Enteritidis* pertencentes ao PT 4, prevalente no Brasil, sejam consideradas extremamente homogêneas (STANLEY et al., 1991), a técnica foi descrita como capaz de evidenciar diferenças menores entre clones, portanto adequada para uso como ferramenta de genotipificação. Essa variabilidade do patógeno não foi detectada através de técnicas baseadas em hibridização (POWELL et al., 1994). PFGE pode ainda apresentar capacidade de discriminação de bactérias superior a outras metodologias que envolvem a análise de DNA, como *multilocus sequence typing* (MLST) (FAKHR et al., 2005; TORPDAHL et al., 2005).

O envolvimento de vetores na manutenção de *S. Enteritidis* em granjas de matrizes foi comprovado através da identificação de genótipos idênticos nas linhagens analisadas por PFGE, reforçando sua utilidade como ferramenta para investigação epidemiológica (LIEBANA et al., 2003). Na investigação de surtos causados pelo consumo de alimentos contaminados, a técnica auxilia na determinação da relação entre as linhagens isoladas de pacientes e de alimentos, permitindo assim a identificação da fonte de contaminação (AHMED et al., 2000; SANDT et al., 2006; HOLTBY et al., 2006). PFGE comprovou também auxiliar na identificação das rotas de transmissão de *Salmonella* dentro da cadeia produtiva (WOO, 2005; LANGVAD et al., 2006).

Por outro lado, a ribotipificação tem se mostrado uma técnica mais discriminatória na análise de *S. Enteritidis* (LIEBANA et al., 2001). Contudo, a técnica utilizada isoladamente identificou somente dois perfis em linhagens isoladas de pacientes hospitalizados entre

1996 e 1998 em São Paulo, dos quais um foi predominante (MARTINS et al., 2006). Numa amostragem maior, abrangendo *S. Enteritidis* de diferentes fontes isoladas num período de 20 anos no Brasil, foram identificados 14 padrões de ribotipificação, evidenciando uma maior variabilidade (FERNANDES et al., 2003).

A grande maioria dos trabalhos que envolvem a análise de *S. Enteritidis* por PFGE utilizam protocolos padronizados, nos quais o DNA genômico é clivado com *Xba*I. Deste modo, é obtido um grau satisfatório de discriminação entre as linhagens e é possível comparar os perfis aos obtidos por diferentes grupos de pesquisa que utilizam o mesmo protocolo e as mesmas condições de macrorestrição e PFGE. No entanto, com a utilização de diferentes enzimas com sítios raros de restrição, aumenta a possibilidade de se obter um melhor grau de discriminação das amostras (FERNANDEZ et al., 2003). Porém, deve ser considerado o extenso tempo de corrida da eletroforese, além do custo financeiro do ensaio, os quais, geralmente, restringem o número de análises por PFGE (LIEBANA et al., 2001).

A combinação de ensaios fenotípicos e genotípicos auxilia no esclarecimento da epidemiologia do patógeno, através do rastreamento das linhagens e identificação de surtos de salmonelose (LIEBANA et al., 2001), principalmente considerando as limitações peculiares de cada técnica de subtipificação. Adicionalmente, a utilização de diferentes métodos de genotipificação aumenta a capacidade de discriminar as linhagens, uma vez que cada método detecta polimorfismos em regiões diferentes do genoma analisado (LIEBANA et al., 2002). Deve-se ainda considerar que uma técnica molecular isolada pode não ser adequada na subtipificação de um microrganismo, conforme já relatado em estudos envolvendo a caracterização de *S. Enteritidis* por PFGE (HUDSON et al., 2001; LIEBANA et al., 2001). Nesse caso, a tipificação do patógeno por PFGE foi capaz de produzir diferentes perfis, contudo, a maioria das linhagens analisadas foi classificada em um único padrão (LIEBANA et al., 2002; LIEBANA et al., 2002b; BAKERI et al., 2003).

2.9 Técnicas baseadas em na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Algumas vezes, a análise de *S. Enteritidis* unicamente por PFGE não é capaz de discriminar linhagens de origens reconhecidamente distintas (LIEBANA et al., 2002b). Além disso, as principais dificuldades de implantação da metodologia de PFGE em laboratórios de médio porte consistem no elevado custo de aquisição de equipamentos e

reagentes, além da laboriosidade dos procedimentos de execução. Uma alternativa pode ser o emprego de métodos baseados em PCR. Como características favoráveis, estes apresentam maior rapidez e facilidade de realização, além de um menor custo de aquisição dos reagentes.

Entretanto, nenhuma das técnicas propostas tem sido totalmente livre de desvantagens. Embora linhagens pertencentes ao gênero *Salmonella* venham sendo tipificadas em estudos epidemiológicos pela Amplificação aleatória do DNA polimórfico (*Random amplified polymorphic DNA*, RAPD) (HUDSON et al., 2001; BETANACOR et al., 2004), a falta de reprodutibilidade dos resultados entre laboratórios tem sido identificada como uma característica freqüente (OLIVE & BEAN, 1999). A análise pela amplificação de seqüências repetitivas no genoma (Rep-PCR), embora tenha apresentado resultados reprodutíveis ou mesmo superiores a PFGE (WEIGEL et al., 2004; RASSCHAERT et al., 2005), não se mostrou suficientemente discriminatória para uso como único método de genotipificação de linhagens de *S. Enteritidis* e de *S. Typhimurium* isoladas no Rio Grande do Sul (de OLIVEIRA, 2003; BESSA, 2006).

Dentre as diversas técnicas disponíveis, o Polimorfismo de comprimento do fragmento amplificado (*Amplified-fragment length polymorphism*, AFLP) tem demonstrado bons resultados na diferenciação de isolados. Isso provavelmente deve-se à amplificação de fragmentos específicos, realizada sob condições estridentes de PCR, gerando padrões reprodutíveis entre laboratórios. A técnica apresenta alta capacidade de discriminação, que pode ser similar ou superior a da PFGE. Outra característica dos dados produzidos por AFLP é que, semelhante aos padrões obtidos por PFGE, os perfis resultantes podem ser armazenados em bancos de dados, essenciais na investigação de surtos por diferentes laboratórios.

A técnica consiste na restrição enzimática do DNA genômico, seguida da ligação dos fragmentos resultantes a adaptadores fita dupla, os quais são complementares à seqüência de bases do sítio de restrição. A seguir, é realizada a amplificação seletiva por PCR de grupos dos fragmentos resultantes, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos para as seqüências contíguas ao adaptador, acrescido de um ou mais nucleotídeos no DNA alvo original, de modo a selecionar os fragmentos que serão amplificados (VOS et al., 1995; SAVELKOUL et al., 1999; OLIVE & BEAN, 1999).

Inicialmente utilizado como marcador molecular para o mapeamento genético de animais e plantas, AFLP vem sendo amplamente empregado na tipificação de microorganismos (DUIM et al., 1999; TORPDAHL et al., 2005; MIKASOVÁ et al., 2005; GEBREYES et al., 2006). A popularização do ensaio foi maior após o abandono do uso de marcação por radioisótopos (AARTS et al., 1998) em favor da marcação fluorescente dos oligonucleotídeos iniciadores, possibilitando a detecção em seqüenciadores de DNA automatizados (LINDSTEDT et al., 2000; DESAI et al., 2001; SCOTT et al., 2001; TORPDAHL et al., 2005), facilitando, desta forma, sua utilização. Ainda assim, a técnica é de difícil implementação em laboratórios de pequeno e médio porte, os quais, geralmente, não dispõem do sistema.

2.10 Análise por SE-AFLP

Para contornar estas dificuldades e permitir o acesso da metodologia a laboratórios de pequeno porte, uma simplificação da técnica, conhecida como Polimorfismo de comprimento do fragmento amplificado utilizando uma única enzima de restrição (*Single-enzyme amplified fragment length polymorphism*, SE-AFLP) vem sendo utilizada por diversos grupos na tipificação de diferentes gêneros bacterianos (GIBSON et al., 1998; VELAPPAN et al., 2001; MORENO et al., 2003; van der ZEE et al., 2003). Como modificação, o ensaio preconiza a restrição do DNA genômico utilizando uma única enzima de restrição, seguido da amplificação seletiva destes fragmentos por PCR. Os fragmentos resultantes são de menor complexidade e podem ser analisados após eletroforese em gel de agarose.

SE-AFLP foi considerada uma metodologia alternativa ao uso de PFGE na análise de *Campylobacter jejuni*, visto que a capacidade de discriminação encontrada por ambas as técnicas foi equivalente (CHAMPION et al., 2002). A alta capacidade de discriminação da técnica foi também evidenciada na análise de *Clostridium perfringens*, na qual diferentes padrões de SE-AFLP foram identificados em linhagens pertencentes a um mesmo sorotipo (McLAUHLIN et al., 2000).

De modo semelhante, na análise de *S. Typhimurium* essa metodologia demonstrou boa capacidade de caracterização das linhagens, indicando que pode ser utilizada isoladamente ou, ainda, associada a PFGE, de modo a produzir um melhor grau de

caracterização (SOOD et al., 2002). Diferentes sorovares de *S. enterica* puderam ser diferenciados com base nos genótipos obtidos por SE-AFLP (PETERS & THRELFALL, 2001), contudo poucas linhagens de *S. Enteritidis* foram analisadas, o que não permitiu verificar a capacidade da metodologia na análise deste sorovar.

Ainda que SE-AFLP seja mais laborioso do que outras metodologias baseadas em PCR, como RAPD e rep-PCR, o ensaio costuma produzir um maior número de fragmentos, exceto quando comparado a RFLP. O ensaio detecta pequenas modificações no genoma, como a aquisição de fragmentos móveis de DNA, relevantes na tipificação de microrganismos. O polimorfismo produzido pode ser resultante de mutações, elisões ou acréscimo de nucleotídeos no genoma, além de mutações nos sítios de restrição ou variações no comprimento dos fragmentos resultantes da clivagem. A técnica ainda evidencia variações nos nucleotídeos que flanqueiam a extremidade 3' seletiva do oligonucleotídeo iniciador (SAVELKOUL et al., 1999).

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1 Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns from poultry, human and food *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolated from Southern Brazil *

*Manuscrito a ser submetido a periódico científico na forma de artigo original.

Antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns from poultry, human and food *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolated from Southern Brazil

Clarissa Silveira Luiz Vaz^a, André Felipe Streck^a, Tatiana Tramontina^b,
Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso^c, Cláudio Wageck Canal^{a*}

^aLaboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^bFundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (IPB, LACEN/ Rio Grande do Sul, Brazil)

^cLaboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

*Corresponding author. Av. Bento Gonçalves, 9090, 91540-000, Porto Alegre, RS. Brazil. Tel.: 55 51 3316 6926; fax: 55 51 3316 7305. *e-mail address*: claudio.canal@ufrgs.br (C.W. Canal).

Abstract

In order to investigate antimicrobial resistance, 96 Salmonella enterica subsp. enterica (S.) serovar Enteritidis strains isolated from food and humans involved in salmonellosis outbreaks and poultry-related products obtained in Southern Brazil were analyzed. The genetic relatedness of these strains was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). All strains were susceptible to ampicillin, cephaclor, ceftazidime, ciprofloxacin, chloramphenicol and neomycin. While 43.75% of samples were sensitive to all drugs tested, resistance to sulfonamide (33.33%), trimethoprim-sulfamethoxazole (25%), nalidixic acid (14.58%), streptomycin (2.08%), gentamicin and tetracycline (1.04%) was identified. Resistance rates found in strains isolated from poultry were significantly higher than resistance rates found in strains from humans ($P < 0.05$). A predominant PFGE genotype represented by 82.29% of the strains was distributed among poultry, food and human isolates. Although it was not possible to associate strains from different sources, the occurrence of resistant strains supports the requirement to establish antimicrobial control and monitoring programs in Brazil to avoid emergence of these strains.

Keywords: Salmonella Enteritidis; Antimicrobial resistance; Pulsed-field gel electrophoresis; Poultry, Salmonellosis, Brazil.

1. Introduction

The global incidence of human infection by Salmonella enterica subsp. enterica serovar Enteritidis (S. Enteritidis) has risen dramatically since 1990 [1, 2]. The high prevalence of S. Enteritidis in fowls [3] suggests that poultry must be an important epidemiological reservoir [2,4-5]. S. Enteritidis has been associated in Brazil with human food-borne infections caused by the ingestion of contaminated food of animal origin, mainly undercooked poultry meat and eggs [6-7], and has emerged as the most frequent serovar isolated from human illness [8-9]. Different countries, including Brazil, have reported the same S. Enteritidis phage type (PT) 4 [10-11], which is associated with poultry [2,5]. This phage type has probably a single common source and was dispersed through international trade [1-4]. It has been suggested that the emergence of S. Enteritidis results from modern poultry farming practices and from a decline in the genetic diversity of domestic fowl [12].

On the other hand, prevalence of antimicrobial resistant bacteria has risen worldwide in the last decades. Campylobacter jejuni infections in human are commonly caused by fluoroquinolones resistant strains in developed countries [13]. The incidence of multidrug-resistant Salmonella Typhimurium definitive phage type (DT) 104 has also increased widely [14]. Selection pressure exerted by the use of antimicrobial drugs to promote growth or disease prophylaxis in food-producing animals is pointed as the most important way to induce the emergence of resistant bacteria. Since these animals can act as reservoir of resistant bacteria, food-borne disease can spread resistant strains from animals to humans [15-16]. Furthermore, many antimicrobial agents used in animals represent the same classes that may be used in human medicine [17-18]. Thus, the emergence of resistant pathogens

from animals represents an important public health concern. Human gastroenteritis caused by salmonellosis is usually self-limited. However, antimicrobial therapy may be necessary in invasive infections, especially in immune compromised patients. In these cases, antimicrobial resistant strains can play a critical role in successful treatments.

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is the best-standardized fingerprinting method for bacterial genome analysis. Since it has been considered the golden standard among the molecular typing methods, it is commonly used for bacterial genome analysis [19]. Thus, PFGE following macrorestriction with XbaI has been widely used in epidemiological surveillance of antibiotic-resistant *Salmonella* strains because of its discriminatory power and reproducibility [20-21].

Until recently, S. Enteritidis strains have been sensitive to most of the antimicrobial agents tested [22]. Overall, studies have shown low or moderate levels of antimicrobial resistance in S. Enteritidis isolated in Brazil [8,23-25], but high levels were also reported [26]. Since the poultry industry is an important segment in southern Brazil, which exports poultry meat to many countries, underlining the importance of antimicrobial resistance surveillance. The aim of this study was investigate the genetic relatedness by PFGE and antimicrobial resistance to antimicrobial classes with medical importance in S. Enteritidis isolated from poultry-derived products, from food samples involved in salmonellosis outbreaks in southern Brazil and from humans.

2. Materials and methods

2.1 *Salmonella* Enteritidis strains and other bacterial strains

A total of 96 *S.* Enteritidis isolates were recovered during 1995 to 2003 in Southern Brazil (State of Rio Grande do Sul). Fifty three strains isolated from poultry-related products (poultry carcass, raw poultry meat, viscera and environmental swab), 14 strains from humans (patients hospitalized with food poisoning and food handlers) and 29 strains from food related or not related to poultry meat and eggs involved in these salmonellosis outbreaks reported by the surveillance service in Rio Grande do Sul (FEPPS, IPB, LACEN/RS).

2.2 Antimicrobial susceptibility testing

S. Enteritidis strains were investigated for susceptibility to 11 different antimicrobials, representing some of the classes commonly used in human therapy. Agar disk diffusion method was carried out as described by NCCLS [27]. All strains were tested with the following antimicrobials agents (Sensifar, Brazil): ampicillin (10 µg), cephaclor (30 µg), ceftazidime (30 µg), nalidixic acid (Nx, 30 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (G, 10 µg), neomycin (30 µg), streptomycin (Str, 10 µg), tetracycline (T, 30 µg), sulfonamides (S, 300 µg) and trimethoprim-sulfamethoxazole (Sxt, 25 µg). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as a reference strain to disk control.

2.3 DNA macrorestriction analysis

Whole cell DNA for PFGE was obtained as previously described [28]. DNA in agarose plugs was incubated for 12 h with 20 U of XbaI (Fermentas Life Sciences, USA). PFGE was performed according to the protocol used by the Salm-gene project in Europe [19]. The DNA fragments were electrophoresed in a CHEF-DR II system (BioRad, Brazil) on a 1% agarose gel (PFGE certified, BioRad, Brazil) with 0.5X TBE as running buffer for 22 h at 6 V/cm. The pulse time was increased from 2 to 64 s. Salmonella Typhimurium LT2 DNA [29] digested with XbaI was used as size standard. Agarose gel was stained by ethidium bromide (1 µg/ml, Invitrogen, Brazil) and registered by digital capture (UltraLum, Paramount, CA). Macrorestriction patterns were compared by NTSYS software version 1.8 (Applied Biostatistics, New York). Similarity was calculated by the Dice coefficient, whereas a dendrogram was obtained by cluster analysis using the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA).

2.4 Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the WINPEPI software. Multiple pairwise comparisons were performed by Tukey procedure, using the Describe module version 1.55. Comparison between groups was performed by Compare2 module version 1.45, using the χ^2 test or Fisher's exact test when appropriate.

3. Results

3.1 Antimicrobial susceptibility

From the S. Enteritidis strains analyzed, 42 (43.75%) were sensitive to all antimicrobial agents tested. All strains were susceptible to ampicillin, cephaclor, ceftazidime, ciprofloxacin, chloramphenicol, and neomycin. Opposite to that, resistance to at least one until three antimicrobial drugs was detected among S. Enteritidis isolates, being 37 (69.81%) strains isolated from poultry derived-products, 4 (28.57%) from humans and 13 (44.83%) from food. Resistance rates found in poultry strains were significantly higher than that observed in human strains ($P < 0.05$). The highest percentage of resistance was identified to sulfonamides, trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid; and a lower percentage of resistance to streptomycin, gentamicin and tetracycline (Table 1).

We verified that 18.75% of the S. Enteritidis strains were resistant to two or three antimicrobial agents. As showed in Table 2, only three strains were multiple-resistant (resistance to three drugs), being two strains isolated from poultry viscera, resistant to NxSSxt and StrGS, and one strain isolated from a patient with salmonellosis. The distribution of antimicrobial resistance among the years analyzed showed resistance to sulfonamides and trimethoprim-sulfamethoxazole in strains isolated in all years, except 1997 and 2001, respectively. Strains resistant to nalidixic acid were isolated from 1997 until 2003, to streptomycin and gentamicin were isolated in 1999, whereas to tetracycline was isolated in 1997.

A total of 11 antimicrobial resistance patterns were identified (Table 2), whereas the predominant pattern was S. Such pattern (S) and also Stx resistance pattern were found in strains isolated from poultry, human and food sources. There was statistical difference in

resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole between isolates from food and from poultry derived-products ($P < 0.01$). Resistance to tetracycline was identified only in one strain isolated from humans, which showed the TSSxt resistance pattern. Furthermore, the remaining antimicrobial profiles were primarily associated with strains isolated from poultry-related products. Thus, resistance to nalidixic acid, gentamicin and streptomycin was found only in poultry-derived products. According to nalidixic acid resistance, there was statistical difference between strains from food and poultry ($P < 0.001$) and between strains from human and poultry ($P < 0.05$).

3.2 Pulsed field gel-electrophoresis

Electrophoresis of XbaI-digested DNA from the 96 S. Enteritidis strains displayed 8 close-related macrorestriction genotypes, called X1 to X8 (Figure 1). The predominant macrorestriction pattern (X1) was shared by 79 (82.29%) strains isolated from poultry products, human and food (Table 2). Such genotype was found in all the years analyzed. The X2 (6.25%) pattern was identified only in isolates from poultry-products and food, and had different antimicrobial resistance profiles, while X8 (5.26%) was detected in poultry strains isolated from nearby cities in 2003, which also displayed distinct antimicrobial phenotypes (NxS and NxSxt). The X5 (2.08%) pattern was identified in two strains isolated from food not-related to poultry products isolated from different cities in the 1996, which shared the same antimicrobial pattern. The remaining patterns (X3, X4, X6 and X7) were represented by single strains, isolated from poultry carcass, poultry viscera, food not-related to poultry and food with poultry components, respectively. Since identical PFGE profiles were identified in antimicrobial resistant and susceptible strains, it was not possible to find relationship between the PFGE genotypes and the antimicrobial resistance patterns.

4. Discussion

In the present study, antimicrobial resistance was evaluated in S. Enteritidis isolated from poultry-derived products and also from humans and food involved in salmonellosis outbreaks in Southern Brazil. All strains were susceptible to ampicillin, cephaclor, ceftazidime, ciprofloxacin, chloramphenicol and neomycin. These results were expected, since salmonellosis infections are not acquired in hospitals. Selective pressure exerted in food producing animals can be responsible for the transfer of resistant bacteria from animals to humans [16]. In order to prevent the increase of antimicrobial resistance, there is a discussion about the judicious use of antimicrobials drugs in veterinary medicine. Thus, some antimicrobial agents, such as chloramphenicol and nitrofurans, have been banned from use in food-producing animals worldwide [17]. In Brazil, penicillins, tetracyclines, sulfonamides and avoparcin are prohibited since 1998 as animal growth promoters. Chloramphenicol and nitrofurans have been also banned since 2004 [30].

In many countries, ampicillin, chloramphenicol, trimethoprim-sulfamethoxazole, and more recently, fluoroquinolones and third-generation cephalosporins have been the antimicrobials of choice for human therapy in Salmonella infections [15,31]. Although resistance was not found to most of such drugs, resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole was found in three strains isolated from humans, two isolated from food not-related to poultry and in nineteen strains isolated from poultry-derived products.

Opposing to that, sulfonamides (34.37%) showed the higher resistance rate (Table 1), and was observed in poultry (15 strains), food (13 strains) and human isolates (4 strains). S. Enteritidis resistant to sulfonamides has been found worldwide. A low percentage of sulfonamide resistance in strains from human, food and animals was identified in Italy [32].

Higher levels were identified in strains isolated from a Spanish poultry slaughterhouse (99.0%) [33] and also in Brazil (75.8%) [26]. More recently, resistance to such drug was not found in strains isolated from food of the same Brazilian region analyzed in the present study [25]. We must regard that sulfonamides were used for growth promotion in Brazilian poultry until 1998, when such antimicrobial was banished for this purpose, although it is still used as therapeutic purpose. In the present study, the previous use probably reflects in the sulfonamide resistance found in strains isolated from poultry in years after 1998.

Regarding to quinolones and fluoroquinolones, resistance to nalidix acid (14.58%) was identified only in poultry strains. Nalidixic acid and enrofloxacin are the quinolone and fluoroquinolone commonly used for poultry therapy in Brazil. Thus, a higher nalidix acid resistance level was expected in isolates from poultry-related products. Indeed, nalidix acid resistance was significantly higher in strains isolated from poultry than strains from food and humans. High rates of nalidix acid resistance have been found in *S. Enteritidis* isolated from human and poultry sources in Mexico [34], from food, animals and humans in Italy [32] and in Brazil [25], and also from humans in Spain [35]. It was suggested that increase in the incidence of quinolones resistant strains from animals was linked to its licensing for food-producing animals [36]. Fluoroquinolones, especially ciprofloxacin, have a particular concern for human therapy, because such antimicrobial is essential for treatment of invasive gastrointestinal infections [37-38]. Although resistance to ciprofloxacin was not found here and in previous Brazilian studies [6-7,24,26], we must regard that emergence of narrow-spectrum quinolones resistance, as nalidix acid [37], and decreased susceptibility to fluoroquinolones have increased among *Salmonella* spp. from food animals and human infections [36]. Furthermore, some researches have suggested that the extensive use of

enrofloxacin in poultry is associated with emergence of flouoroquinolone resistant strains [13,36].

Although resistance to chloramphenicol was not identified, the finding of some resistant strains could be expected, since trade of such antimicrobial class for poultry use was prohibited in Brazil only in 2003. *S. Enteritidis* isolated from poultry between 1995 and 1997 in Brazil showed resistance to chloramphenicol in 4.8% of the strains [26]. Such antimicrobial resistance was also found in 0.8% of the strains isolated from hospitalized humans [23], and in 1.3% of the strains from food [25]. In Italy, chloramphenicol resistance were not found in strains from animal sources, but were found in a very low percentage in human and food sources [32].

In the present study, the lower resistance levels found were to streptomycin, identified in two strains, and to gentamicin, both isolated from poultry viscera. Although aminoglycosides resistance has been uncommon in *S. Enteritidis* [39-40], it was found in higher percentages in poultry strains isolated from Southern Brazil [26]. One previous study identified resistance to streptomycin in 18% of the human strains analyzed [24], while another survey found resistance to gentamicin (12.7%) and streptomycin (11.4%) [25] in Brazilian food strains. However, aminoglycosides resistance has been found in low levels in strains from hospitalized humans in Brazil [23].

On the other hand, only one strain from a human source was found resistant to tetracycline. Indeed, this result is lower than those found in *S. Enteritidis* from humans in Italy [32], in France [39] and in Spain [35]. In Brazil, resistance to such drug has been also found in human strains, including poultry and food isolates [25,26]. A higher level (43.8%) was found in hospitalized patients from Brazil [23]. Despite we did not find poultry-related strains resistant to such drug, we must regard that tetracycline was banned as growth

promoter in Brazil. So, it was expected a lower rate of resistance, although occurrence of resistant strains in food has still been attributed to the previous use in poultry [25]. Probably, the increasing rates of such resistance lead to changes in tetracycline use, resulting in a decline in its use to poultry therapy and consequently, a decrease in the incidence of resistant strains. In contrast of, the increasing veterinary usage of such antimicrobial in the UK had little impact on the occurrence of S. Enteritidis resistant to tetracyclines [38].

Multi-resistance (resistance to three drugs) was identified in the present study in three strains: one isolate from human and two strains from poultry. This result was lower than that found in poultry, human and food strains from the same region previously analyzed [26]. The percentage of S. Enteritidis resistant to three or more drugs was also low in European countries [40]. It was expected a lower percentage of multi-resistant strains in the present study, since many antimicrobial classes with medical importance were analyzed, which use in food production animals in Brazil is controlled or forbidden. Multiple resistance has been commonly found in S. Typhimurium, specially with the spread of S. Typhimurium DT 104 clones displaying resistance to ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulphonamides and tetracycline [14]. As already noted, S. Typhimurium DT 104 from diverse sources are genetically homogeneous. Different than S. Enteritidis, which resistance seems consistently responsive to antimicrobial selection pressure, S. Typhimurium DT 104 is not correlated with antimicrobial use in food-producing animals.

In Brazil, the occurrence of multi-resistant S. Enteritidis has been associated with hospitalized patients [24]. Furthermore, 11 different resistance patterns were identified in the S. Enteritidis analyzed. In spite of S and SSxt patterns were found in poultry, human

and food strains, the majority of the remaining patterns were presented by poultry strains. With the exception of the TSSxt pattern found in a human strain, isolates from food and human were primarily resistant to sulfonamides and trimethoprim-sulfamethoxazole. These findings support the changes in antimicrobials to human therapy, since trimethoprim-sulfamethoxazole was the choice for therapy in the past [31].

Analyzing the PFGE genotypes obtained with XbaI DNA macrorestriction, the majority of the poultry, food and human S. Enteritidis strains (82.29%) shared the same PFGE pattern (X1). S. Enteritidis usually display genetic homogeneity, evidenced by a prevalent clone [21], which may include animal and also human strains [20,41]. Indeed, the S. Enteritidis strains analyzed in the present study had a minimal genetic diversity, what strongly suggests a close relationship between strains isolated from poultry, food and human sources. As previously described, strains from poultry showed a clonal relationship, probably caused by the spread of one clone by international trade of breeding lines [12]. Whilst increase in incidence of food-borne disease by S. Enteritidis has been found since 1993 in Brazil [8], the higher incidence in breeders and broilers has also been recorded in the same period [3]. Moreover, S. Enteritidis PT4, which displays a clonal structure, is predominant in poultry and food from Southern Brazil [10]. So, results with PFGE confirm these findings, but also identify genotypes probably emerging, as X8 pattern in strains isolated from poultry.

The X5 macrorestriction pattern was observed in two strains isolated from food not related to poultry in 1996, both sharing resistance to sulfonamides (Table 2). However, there was no clear association between PFGE and antimicrobial resistance in most of the S. Enteritidis strains. Whilst X8 PFGE pattern was primarily associated to poultry-products strains isolated in 2003, such genotype showed two different antimicrobial profiles, NxS

and NxSSxt (Table 2). Furthermore, the X1 and X2 patterns were both found in resistant and sensitive strains isolated from poultry-product, foods and humans. Since some strains shared identical PFGE genotype but different antimicrobial resistance patterns, is possible to suggest that such differences in antimicrobial susceptibility were caused by point mutations or genetic changes such as plasmid acquisition, that were insufficient to change the PFGE profile. In spite of that, macrorestriction and antimicrobial resistance patterns were invaluable in building an association between cases of human salmonellosis infections, contaminated food and isolates from poultry. As already noticed, is difficult to find this association because of the complexity of transmission routes from food production animals to humans and also temporal changes in the occurrence of resistance to antimicrobials [18].

The results of the present study showed the occurrence of a dominant PFGE pattern distributed between poultry-related products and also food and human strains involved in salmonellosis outbreaks in Southern Brazil. This finding suggests that the same clone present in poultry is also involved in human salmonellosis outbreaks. In addition, the administration of antimicrobial agents to humans and animals raises a potential risk for the selection of antimicrobial resistant bacteria [18]. Furthermore, antimicrobial drugs used for food animals can be administrated in a way that increases resistance, as subtherapeutic dosage, mass treatment or growth promoters [16-17]. As reported previously, *S. Enteritidis* is a comparatively susceptible serovar [2,22], although resistance in strains from poultry-related products was significantly higher than the resistance found in the human isolates analyzed. The resistance to nalidix acid found in poultry strains address to the prudent use of quinolones in poultry, since increase in its resistance and decrease in fluoroquinolones susceptibility has been previously recorded [37, 36]. We must regard that *S. Enteritidis*

infections may be acquired from ingestion of food from animal origin contaminated with antimicrobial-resistant strains, thus continued antimicrobial resistance surveillance must be taken. The early identification of potential resistance patterns emerging can be determinant to evaluate control measures.

Acknowledgments

The present work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), which also provided a scholarship to C.S.L. Vaz, and by Projeto de Apoio ao Desenvolvimento de Tecnologia Agropecuária para o Brasil (PRODETAB, 083-02/01). We are grateful to Dr. Eliane Falavina dos Reis, from Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Brazil, for *S. Enteritidis* serotyping.

References

1. Rodrigue DC, Tauxe RV, Rowe B. International increase in Salmonella enteritidis: a new pandemic? *Epidemiol Infect* 1990;105:21-27.
2. Threlfall EJ, Chart H. Interrelationships between strains of Salmonella enteritidis. *Epidemiol Infect* 1993;111:1-8.
3. Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM. Serovars of Salmonella spp. isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. *Braz J Poult Sci* 2005;7:195-198.
4. Kimura AC, Reddy V, Marcus R, et al. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic Salmonella enterica serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clin Infect Dis* 2004;38:S244-S252.
5. Coyle EF, Ribeiro CD, Howard AJ, et al. Salmonella enteritidis phage type 4 infection: association with hens' eggs. *Lancet* 1988;332:1295-1297.
6. Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SI, et al. Food borne disease outbreaks caused by Salmonella Enteritidis. *Rev Saúde Públ* 1998;32:477-483.
7. Kaku M, Peresi JTM, Tavechio AT, et al. Outbreak of Salmonella Enteritidis in northwest of S. Paulo State, Brazil. *Rev Saúde Públ* 1995;29:127-131.

8. Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing patterns of Salmonella serovars: increase of Salmonella Enteritidis in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop S Paulo 1996;38:315-322.
9. Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi ACR, Dias AMG, de Almeida IAZC, de Melo LCV. Salmonella serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. Rev Inst Med Trop São Paulo 2006;48:179-184.
10. dos Santos LR, Nascimento VP, de Oliveira SD, et al. Phage types of Salmonella Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2003;45:1-4.
11. Fisher IST. Dramatic shift in the epidemiology of Salmonella enterica serotype Enteritidis phage types in Western Europe, 1998-2003 – results from the Enter-net international Salmonella database. Euro Surveill 2004;9:43-45.
12. Rabsch W, Tschäpe H, Bäumler AJ. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. Microbes Infect 2001;3:237-247.
13. Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T, Mouton RP. Quinolone resistance in Campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. J Antimicrob Chemother 1991;27:199-208.

14. Helms M, Ethelberg S, Molbak K. International Salmonella Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerg Infect Dis* 2005;11:859-867.
15. Threlfall EJ. Antimicrobial drug resistance in Salmonella: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev* 2002;26:141-148.
16. Molbak K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans- the public health consequences. *J Vet Med B* 2004;51:364-369.
17. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* 2001;17:431-437.
18. Phillips I, Casewell M, Cox T, et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:28-52.
19. Peters TM, Maguire C, Threlfall EJ, Fisher IST, Gill N, Gatto AJ. The Salm-gene project- a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Euro Surveill* 2003;108:46-50.
20. Cardinale E, Gros-Claude JDP, Rivoal K, et al. Epidemiological analysis of Salmonella enterica ssp. enterica serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility. *J Appl Microbiol* 2005;99:968-977.

21. Bakeri SA, Yasin RM, Puthucheary SD, Thong KL. Genetic diversity of human isolates of Salmonella enterica serovar Enteritidis in Malasia. J Appl Microbiol 2003;95:773-780.
22. Antunes P, Réu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of Salmonella from poultry products and their susceptibility to antimicrobials agents. Int J Food Microbiol 2003;82:97-103.
23. de Castro FA, dos Santos VR, Martins CHG, Fernandes AS, Zaia JE, Martinez R. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Salmonella serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. Braz J Infect Dis 2002;6:244-51.
24. Fernandes SA, Ghilardi ACR, Tavechio AT, Machado AMO, Pignatari ACC. Phenotypic and molecular characterization of Salmonella Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2003;45:59-63.
25. de Oliveira FA, Brandelli A, Tondo EC. Antimicrobial resistance in Salmonella Enteritidis from food involved in human salmonellosis outbreaks in Southern Brazil. New Microbiol 2006;29:49-54.
26. de Oliveira SD, Flores FS, dos Santos LR, Brandelli A. Antimicrobial resistance in Salmonella enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. Int J Food Microbiol 2005;97:297-305.

27. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals, second ed. Approved Standard M31-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
28. Olsen JE, Skov MN, Threlfall JE, Brown DJ. Clonal lines of Salmonella enterica serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. *J Med Microbiol* 1994;40:15-22.
29. Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. The XbaI-BlnI-CeuI genomic cleavage map of Salmonella typhimurium LT2 determined by double digestion, end labelling and pulsed-field gel electrophoresis. *J Bacteriol* 1993;175:4104-20.
30. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brazil. Legislação. <http://www.agricultura.gov.br> (accessed 14 November 2006).
31. Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen ML. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal Salmonella: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. *Microb Drug Resist* 2000;6:77-83.
32. Busani L, Graziani C, Battisti A, et al. Antibiotic resistance in Salmonella enterica serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. *Epidemiol Infect* 2004;132:245-51.

33. Carramiñana JJ, Rota C, Agustín I, Herrera A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in Salmonella serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet Microbiol* 2004;104:133-9.
34. Zaid MB, McDermott PF, Fedorka-Cray P, et al. Nontyphoidal Salmonella from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. *Clin Infect Dis* 2006;42:21-8.
35. Soler P, González-Sanz R, Bleda MJ, Hernández G, Echeíta A, Usera MA. Antimicrobial resistance in non-typhoidal Salmonella from human sources, Spain, 2001-2003. *J Antimicrob Chemother* 2006;58:310-14.
36. Malorny B, Schroeter A, Helmuth R. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary Salmonella isolates from Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2278-82.
37. Molbak K, Gerner-Smidt P, Wegener HC. Increasing quinolone resistance in Salmonella enterica serotype Enteritidis. *Emerg Infect Dis* 2002;8:514-15.
38. Threlfall EJ, Day M, de Pinna E, Charlett A, Goodyear KL. Assessment of factors contributing to changes in the incidence of antimicrobial drug resistance in Salmonella enterica serotypes Enteritidis and Typhimurium from humans in England and Wales in 2000, 2002 and 2004. *Int J Antimicrob Agents* 2006 In press.

39. Breuil J, Brisabois A, Casin I, Armand-Lefèvre L, Frémy S, Collatz E. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *J Antimicrob Chemother* 2000;46:965-71.
40. Threlfall EJ, Fisher IST, Berghold C, et al. Antimicrobial drug resistance in isolates of Salmonella enterica from cases of salmonellosis in humans in Europe in 2000: results of international multi-centre surveillance. *Euro Surveill* 2003;8:41-45.
41. Liebana E, Clouting C, Garcia-Migura L, et al. Multiple genetic typing of Salmonella Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. *Vet Microbiol* 2004;100:189-195.

Table 1

Antimicrobial resistance found in Salmonella Enteritidis isolated from poultry, humans and food.

Source (number of strains analyzed)	Resistance to antimicrobial (number and %)					
	S	Sxt	Nx	Str	G	T
Food related to poultry meat or eggs (9)	2 (2.22)	0	0	0	0	0
Food not related to poultry products (20)	11 (55.0)	2 (10.0)	0	0	0	0
Patients (10)	3 (30.0)	2 (20.0)	0	0	0	1 (10.0)
Food handlers (4)	1 (25.0)	1 (25.0)	0	0	0	0
Poultry carcass (20)	5 (25.0)	5 (25.0)	1 (5.0)	0	0	0
Raw poultry meat (11)	3 (7.27)	6 (54.54)	4 (36.36)	0	0	0
Poultry viscera (19)	6 (31.57)	8 (41.10)	7 (36.84)	2 (10.52)	1 (5.26)	0
Environmental swab (3)	1 (33.33)	0	2 (66.66)	0	0	0
Total	32 (33.33)	24 (25.0)	14 (14.58)	2 (2.08)	1 (1.04)	1 (1.04)

S, sulfonamides; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; Nx, nalidixic acid; Str, streptomycin; G, gentamicin; T, tetracycline.

Table 2
Distribution of antimicrobial resistance and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns from poultry, human and food *Salmonella* Enteritidis strains.

Antimicrobial resistance pattern (%)	PFGE pattern	Poultry-derived products				Human		Food	
		Poultry carcass	Raw poultry meat	Viscera	Environmental swab	Human	Food handler	Related to poultry meat or eggs	Not related to poultry products
Fully sensitive (43.75%)	X1	7	3	3	1	7	3	5	8
	X2	1		1				1	
	X6								1
	X7							1	
S (19.79%)	X1	6		1		1		2	6
	X2								1
	X5								2
S Sxt (6.25%)	X1		2			1	1		2
Sxt (12.5%)	X1	4	2	4					
	X3	1							
	X4			1					
T S Sxt (1.04%)	X1					1			
Nx S (5.21%)	X1			2	1				
	X8		1	1					
Nx Sxt (3.12%)	X8		2	1					
Nx S Sxt (1.04%)	X1			1					
Nx (5.21%)	X1	1	1	2	1				
Str G S (1.04%)	X2			1					
Str S (1.04%)	X2			1					

S, sulfonamides; Sxt, trimethoprim-sulfamethoxazole; T, tetracycline; Nx, nalidixic acid; Str, streptomycin; G, gentamicin.

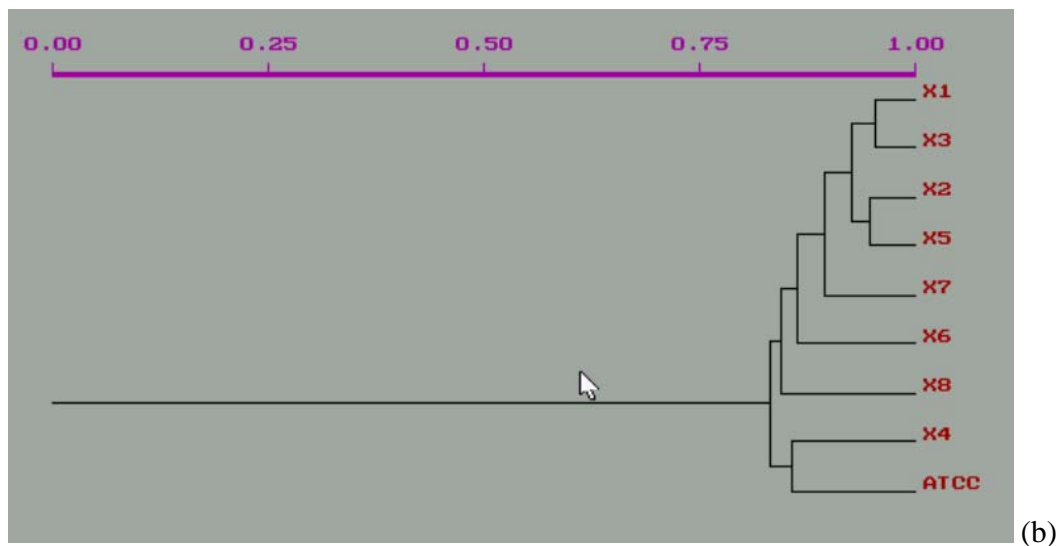
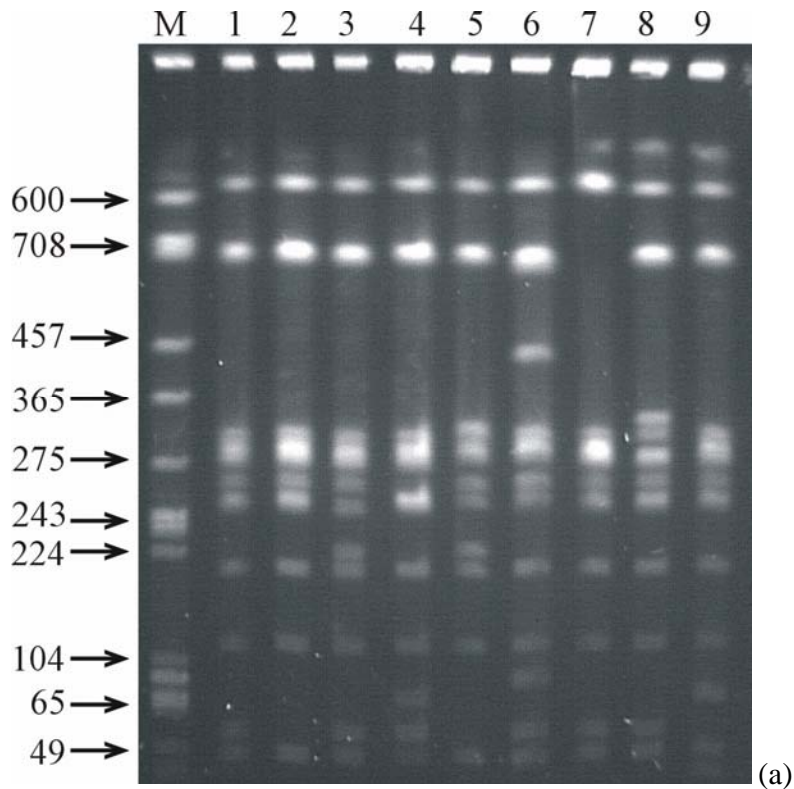


Figure 1. Macrorestriction patterns of *Salmonella* Enteritidis isolates obtained with *Xba*I. Lane M, *Xba*I-digested DNA (kb) of *S.* Typhimurium LT2; lanes 1-8, representative X1-X8 PFGE patterns; lane 9, *S.* Enteritidis ATCC 13076 (a). A dendrogram shows the relationships of the *S.* Enteritidis *Xba*I patterns. Similarity analysis was performed using the Dice coefficient and the clustering was generated by UPGMA method (b).

3.2 Use of a modified AFLP protocol to discriminate *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates*

*Manuscrito aceito para publicação na forma de artigo original no periódico Acta Scientiae Veterinariae.

Use of a modified AFLP protocol to discriminate *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates

Clarissa Silveira Luiz Vaz^{1,2}

André Felipe Streck²

Tatiana Tramontina⁴

Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso³

Cláudio Wageck Canal^{2*}

1. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

2. Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

3. Laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

4. Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (IPB/LACEN-RS), Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author; e-mail address: claudio.canal@ufrgs.br; fax: 55 51 3316 7305.

Abstract

Salmonella enterica subsp. *enterica* (*S.*) serovar Enteritidis is one of the main pathogens involved in food-borne diseases worldwide. In epidemiological investigations of food-related salmonellosis, subtyping is necessary to improve preventive and control measures. Single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) analysis is a modified AFLP that uses only one restriction enzyme to produce DNA fragments that are selectively amplified by PCR. In order to assess the applicability of SE-AFLP in *S. Enteritidis* typing, one hundred and eight strains isolated from poultry, swine and also from human salmonellosis outbreaks in Southern Brazil were analyzed. Strains from other countries and six different *S. enterica* serovars were also included as controls. SE-AFLP was able to distinguish *S. Enteritidis* from the other *S. enterica* serovars analyzed. However, most of *S. Enteritidis* strains isolated from poultry, salmonellosis outbreaks and most of the strains from other countries shared the same predominant pattern. The low genetic diversity identified in *S. Enteritidis* suggests that the strains analyzed are clonally related and one predominant SE-AFLP genotype is widely spread in Southern Brazil.

Key words: *Salmonella* Enteritidis; SE-AFLP; Genotyping; Poultry.

1. Introduction

Salmonella enterica subsp. *enterica* (*S.*) serovar Enteritidis has emerged worldwide as the most common bacteria isolated from human salmonellosis [1], and infections have occurred in Brazil since 1990s [2]. Since *S. Enteritidis* has a wide range of animal reservoirs and a high spread potential, improvements in epidemiological surveillance are currently necessary. In this sense, accurate characterization is crucial to differentiate pathogenic strains from less-pathogenic ones, as well as to study strain origin, evolution and major infection routes, which will direct preventive and control measures.

Phage typing is the method of choice for *S. Enteritidis* characterization. However, because of the predominance of some phage types [3-5], molecular typing became important for strain characterization and has been associated with the traditional phenotypic methods to improve discriminatory power. A range of these molecular approaches is available for such investigation [6-9] and there is consensus on the use of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) as a standard typing approach for genotyping [10]. However, PFGE is technically demanding and time-consuming.

Amplified-fragment length polymorphism (AFLP) typing presents a high power of strain discrimination [11], although the detection of DNA amplification fragments must be performed in polyacrylamide gels or by means of the analysis of fluorescent labeled fragments on automated DNA sequencer. A single-enzyme approach to AFLP (SE-AFLP) may constitute an alternative, since genomic DNA is digested with a restriction enzyme followed by selective amplification of a subset of fragments. These resulting PCR-amplified DNA fragments are less complex and can be analyzed by agarose gel electrophoresis [12-13]. SE-AFLP has been widely used for typing of different bacterial

pathogens [14-17] and some *Salmonella* serovars [18-19], but there are no reports of SE-AFLP use to analyze comprehensive *S. Enteritidis* strain collections. In the present study, an SE-AFLP protocol was standardized and evaluated for the characterization of *S. Enteritidis* isolates from different sources.

2. Materials and methods

2.1 Bacterial isolates

A total of 114 strains of *S. enterica* were analyzed in this study (Table 1). *S. Enteritidis* from poultry, swine, food and humans were isolated from 1995 up to 2003 in Southern Brazil (State of Rio Grande do Sul). Food and human strains were isolated from salmonellosis outbreaks reported in Rio Grande do Sul and were kindly supplied by the government surveillance service (FEPPS, IPB, LACEN/RS). We also included some *S. Enteritidis* strains isolated from unknown sources and year of isolation in other countries. *S. Enteritidis* ATCC 13076 was used as SE-AFLP pattern control.

2.2 DNA extraction

Bacterial cultures grown overnight in brain and heart infusion at 37°C were used for genomic DNA extraction by cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) method [20]. The DNA was precipitated and resuspended in 100 µL TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) and the concentration and quality of the samples were determined by absorbance readings at 260 and 280 nm.

2.3 Restriction endonuclease digestion and ligation of oligonucleotides adapters

An aliquot containing 4 µg of DNA was digested at 37°C for 3 h with 2 U of *HindIII*¹ in 10 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.1 mg/mL BSA in a final volume of 50 µL. DNA fragments were precipitated and resuspended in TE buffer. A 5 µL digested DNA aliquot was used in a ligation reaction containing 1 U of T4 DNA ligase¹,

ligase buffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP, pH 7.8) and 0.2 µg of each oligonucleotide adapters² [21] in a final volume of 20 µL at 16°C for 4 h. The ligated DNA was precipitated with 2.5 mM ammonium acetate and absolute ethanol, washed with 70% ethanol and resuspended in 50 µL of TE buffer.

2.4 PCR amplifications

The PCR assays were performed in a DNA thermal cycler³. Primers² [21] were complementary to the adapter sequence, differing in the 3' final' base (A, T, C or G). These primers were called HI-A, HI-T, HI-C and HI-G, respectively. The PCR mixture contained the reaction buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 2.5 mM or 3.0 mM MgCl₂⁵, 20 pmol of a single primer, 200 µM of each dNTP⁴, 1 U of *Taq* DNA polymerase⁵, 5 µL of ligated DNA as template and distilled water in a total volume of 25 µL. The reaction mixture was amplified under the following conditions: an initial denaturing step of 94°C for 4 min, followed by 36 cycles of 94°C for 1 min, 57°C for 1 min and 72°C for 2.5 min. Amplified fragments were separated by electrophoresis in a 1.5% (wt/vol) agarose gel¹ in Tris-borate buffer (0.045 M Tris-borate, 0.001M EDTA). Gel was stained with ethidium bromide¹ (0.5 µg/mL) and registered by digital image capturing system⁶. PCR reactions with each primer were repeated to assess the reproducibility of SE-AFLP patterns.

3. Results

SE-AFLP analysis evaluated DNA segments obtained from *Hind*III digestion, which were distributed all over the *Salmonella* genome. The adapter oligonucleotides used were complementary sequences to *Hind*III fragments that were ligated to each end of the restriction fragment and were tagged to PCR amplification. Subsets of the ligated fragments were selectively amplified, since the primers used had one additional nucleotide (A, T, G or C) as the final 3' base, which extended into the restriction fragment.

For PCR analysis, MgCl₂ concentrations of 2.0, 2.5 and 3.0 mM were initially tested with each primer. Primers HI-C, HI-T and HI-A displayed better amplification patterns using 2.5 mM MgCl₂ in the PCR reaction, while primer HI-G gave better results with 3.0 mM MgCl₂. These PCR conditions were applied to the remaining *Salmonella* strains.

In an initial screening, randomly selected *S. Enteritidis* cultures were used to assess the suitability of the four selective primers according to quality of the amplified fragments. Each strain was analyzed using one single primer PCR-reaction and each primer tested produced reasonably well-defined banding patterns (data not shown). However, primer HI-A produced few bands, making comparative analysis difficult. So, the remaining primers were selected for further evaluations.

Although there were a number of shared bands, *S. Enteritidis* genotypes could be distinguished from other *Salmonella* serovars by the polymorphism in the number and length of the amplification products (Figure 1). Among the *S. Enteritidis* isolates tested, primer HI-G produced three different genotypes. A predominant pattern was found in the majority of the strains and designated HI-G1, while the remaining patterns were identified in a strain from Tanzania (HI-G2) and in an isolate from swine (HI-G3). Analysis with

primer HI-T produced a predominant pattern (HI-T1) and also two alternative profiles: HI-T2 in a strain from Italy, and HI-T3 in an isolate from swine. Primer HI-C displayed a predominant pattern (HI-C1), the HI-C2 pattern in a poultry strain, and HI-C3 in one isolate from swine (Figure 2). All primers tested clustered the strains from human outbreaks in the predominant SE-AFLP pattern, as well as most of the strains from poultry. Furthermore, the alternative genotypes were identified only in the strains from the other sources and none in the strains related to human outbreaks. *S. Enteritidis* ATCC 13076 displayed the predominant SE-AFLP pattern found with each primer. Table 1 shows the SE-AFLP patterns found in the *Salmonella* strains analyzed.

All SE-AFLP patterns were reproducible. DNA from strains that showed alternative patterns were re-extracted, ligated and amplified. Identical banding profiles were obtained from these strains.

4. Discussion

The present study describes the application of SE-AFLP protocol for genotyping *S. Enteritidis* strains isolated from different sources in Brazil. *S. Enteritidis* infections are worldwide associated with the consumption of *S. Enteritidis* contaminated poultry-derived products [5,22]. In Brazil, *S. Enteritidis* outbreaks are probably related to the high incidence of this pathogen in broiler chickens [23], and most of the occurrences reported were associated with poultry products, mainly eggs [24-25]. This is why the majority of the strains analyzed in the present study were isolated from poultry. In order to test the ability of SE-AFLP in strain characterization, *S. Enteritidis* isolates from other countries were also included, since they are probably unrelated to the Brazilian strains. Although *Salmonella* serovars have been typed by this method in previous studies [18-19], few strains were tested. In the present study, we proposed the analysis of a large number of samples, including strains isolated from different sources and years.

Using SE-AFLP based on primers HI-G, HI-C and HI-T, most *S. Enteritidis* strains displayed a predominant genotype, found in 106 strains. In addition, some strains that shared the same pattern with one primer could be distinguished by another primer. Although previous studies choose one primer only to test bacterial strains by SE-AFLP [19,21], the present study verified that the analysis with different primers by SE-AFLP might produce alternative patterns from the same strain.

As expected, the SE-AFLP approach was able to distinguish *S. Enteritidis* from the other *Salmonella enterica* serovars analyzed. Differences between *S. Enteritidis* pattern and other *Salmonella* serovars have been found in a previous application of SE-AFLP [18], suggesting the reliability of this approach for *Salmonella* typing.

The *S. Enteritidis* strain isolated from swine had alternative SE-AFLP patterns (HI-T3, HI-G3 and HI-C3), which were different from those found in poultry strains. Although only one porcine strain was analyzed, a different species could spread clones different from those found in poultry. On the other hand, all *S. Enteritidis* strains from salmonellosis outbreaks displayed the same predominant pattern found in the strains isolated from other sources. Since strains from human outbreaks and the strains from the other sources shared the same genotype, probably the same clone was dispersed causing infections in both poultry and humans. Furthermore, the predominant SE-AFLP genotype identified in Brazilian strains was also found in the majority of the *S. Enteritidis* isolated from European and African countries analyzed. This observation can indicate that a predominant clone is spread worldwide. As previously reported, *S. Enteritidis* shows a highly clonal population structure [6,26], which may be the result of modern poultry farming practices and drove the clonal expansion of a single isolate following its introduction into breeding lines through international trade [27,28]. In Brazil, the increase of *S. Enteritidis* has been associated to the rise of phage type (PT) 4 [3], the clonal structure of which has been reported [6,26]. Since PT4 is also predominant in Southern Brazil [29], it is possible that the present SE-AFLP results confirmed this assumption. Overall, only very accurate approaches may be able to detect minor differences in these strains.

Different molecular approaches have been reported for *S. Enteritidis* typing. Currently, the most reliable and effective approach for *Salmonella* spp. characterization in epidemiological investigations is a combination of different methods [6-9,26,30]. PCR-based approaches are usually adopted by smaller laboratories, but random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis have displayed non-reproducible patterns and inconsistent band intensity [30], and limited discriminatory power has also been reported in

repetitive sequence polymerase chain reaction (Rep-PCR) analysis [8]. AFLP has been recorded as highly discriminatory and reproducible [11], although the complexity of the patterns obtained needs to be resolved on acrylamide gels or analysis of fluorescent labeling on automated DNA sequencer. On the other hand, PFGE has been the most consistently standardized method for *S. Enteritidis* genotyping [10], although it is more expensive and time-consuming than PCR-based approaches, which has limited its use. The present study aimed to test SE-AFLP as an alternative approach to PFGE and the original AFLP methodology.

SE-AFLP analysis provides a means for examining DNA segments distributed over the entire *Salmonella* genome, which is advantageous over other methods that evaluate specific genomic sites, as rep-PCR approach [8,31]. Furthermore, multiple bands obtained with this approach are derived from all over the genome, which prevents over interpretation due to point mutations or single-locus recombinations that may affect other genotypic characteristics [11]. Reproducibility is an essential property of molecular approaches. In the present work, the *S. Enteritidis* strains analyzed were proven to exhibit identical SE-AFLP patterns following DNA re-extraction, which confirmed that the approach was reproducible. Furthermore, SE-AFLP used stringent PCR conditions that minimized the lack of reproducibility commonly observed in RAPD analysis.

In the present study, not all tagged fragments were amplified by PCR, allowing to visualize the results after electrophoresis in agarose gels. SE-AFLP was relatively simpler and cheaper than AFLP and PFGE, although it did not afford sufficient sensitivity to differentiate the *S. Enteritidis* strains analyzed. Other researchers previously demonstrated different *S. Enteritidis* strains sharing the same SE-AFLP pattern; however, the number of strains analyzed was small [10]. This approach displayed less diversity than PFGE in

Salmonella Typhimurium analyses, although some of these strains were epidemiologically related [19]. It is important to remember that clonal populations are also found in *S. Typhimurium* associated to the appearance of antimicrobial resistance [28]. On the other hand, SE-AFLP was able to distinguish non-clonally related bacteria, as *Clostridium perfringens* [14], *Klebsiella pneumoniae* [15], *Pasteurella multocida* [16], *Campylobacter jejuni* [17] and *Helicobacter pylori* [21].

In order to improve the discriminatory power of SE-AFLP, a mixture of the four primers in the same PCR reaction has allowed a more complex and discriminative pattern of bands in *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* genotyping [32]. More detailed characterization may be obtained by fluorescent AFLP (FAFLP), using two restriction enzymes and fluorescent labeled primers, the amplification fragments of which are detected on automated DNA sequencers. This approach was able to generate distinct profiles in different phage types of *S. Enteritidis* [33] including PT4 [34]. FAFLP also displayed a high discriminatory power with different *Salmonella* serovars [35]. Furthermore, restriction enzymes other than *HindIII* might produce different fingerprinting. The fingerprintings obtained with DNA restriction by *PstI*, *NheI*, *EcoRI* and *XbaI* followed by ligation with the appropriate adapters and PCR amplification maximized the SE-AFLP discriminatory power in *Klebsiella pneumoniae* [15].

Nowadays, epidemiological investigations of *S. Enteritidis* include subtyping by molecular approaches, since the phenotypic methods may be unable to find minor differences present in the same strain. In the present study, SE-AFLP displayed reproducible banding patterns, although most of the strains shared a predominant SE-AFLP genotype. The low genetic diversity suggests that the strains analyzed are clonally related. In order to definitively assess SE-AFLP use for *S. Enteritidis* genotyping, further studies

using the same strains must compare the SE-AFLP results with the ones generated by other molecular approaches.

5. Conclusion

SE-AFLP analysis provided a simple approach for typing *Salmonella*, producing reproducible banding patterns. This approach was able to distinguish the *S. enterica* serovars tested. However, most of *S. Enteritidis* strains isolated from poultry shared a predominant SE-AFLP pattern, which was also found in strains isolated from salmonellosis outbreaks and from other countries. The present findings suggest that most of strains analyzed are clonally related and this predominant genotype is widely spread. Further analysis will have to compare SE-AFLP with other typing methods to assess the discriminatory power of the different methods for *S. Enteritidis* characterization.

Acknowledgments

C.S.L. Vaz and this work were supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 140993/03-7) and Projeto de Apoio ao Desenvolvimento de Tecnologia Agropecuária para o Brasil (PRODETAB, 083-02/01).

Sources and manufacturers

¹Fermentas Life Sciences, Hanover (MD), USA.

²Invitrogen, Carlsbad (CA), USA.

³Applied Biosystems GeneAmp 2400, USA

⁴Ge Healthcare, Piscataway (NJ), USA

⁵CenBiot, Porto Alegre (RS), Brazil.

⁶UltraLum, Paramount (CA),USA.

References

- 20 Ausbel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.D., Smith J.A. & Struhl K. 1999. *Short protocols in molecular biology*. 4th edn. New York:Wiley, 1104p.
- 27 Bäumler A.J., Hargis B.M. & Tsois R.M. 2000. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science*.287:50-52.
- 7 Betancor L., Schelotto, F., Martinez A., Pereira M., Algorta G., Rodríguez M.A., Vignoli R. & Chabalgoity J.A. 2004. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. 2004. *Journal of Clinical Microbiology*.42:1155-1162.
- 17 Champion O.L., Best E.L. & Frost J.A. 2002. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to *Campylobacters*. *Journal of Clinical Microbiology*.40:2263-2265.
- 34 Desai M., Threlfall E.J. & Stanley J. 2001. Fluorescent-amplified fragment length polymorphism subtyping of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 clone complex. *Journal of Clinical Microbiology*.39:201-206.

29 **dos Santos L.R., Nascimento V.P., de Oliveira S.D., Rodrigues D.P., dos Reis E.M.F., Seki L.M., Ribeiro A.R. & Fernandes S.A. 2003.** Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.45:1-4.

11 **Duim B., Wassenaar T.M., Rigter A. & Wagenaar J. 1999.** High-resolution of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*.65:2369-2375.

4 **Fisher I.S.T. 2004.** Dramatic shift in the epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in Western Europe, 1998-2003 – results from the Enter-net international *Salmonella* database. *Euro Surveillance*.9:43-45.

21 **Gibson J.R., Slater E., Xerry J., Tompkins D.S. & Owen R.J. 1998.** Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*.36:2580-2585.

8 **Gebreyes W.A., Altier C. & Thakur S. 2005.** Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. *Epidemiology and Infection*.134:187-198.

26 **Hudson C.R., Garcia M., Gast R.K. & Maurer J.J. 2001.** Determination of close genetic relatedness of the major *Salmonella* enteritidis phage types by pulsed-field gel

electrophoresis and DNA sequence analysis of several *Salmonella* virulence genes. *Avian Diseases*.45:875-886.

3 **Irino K., Fernandes S.A., Tavechio A.T., Neves B.C. & Dias A.M.G. 1996.** Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.38:193-196.

24 **Kaku M., Peresi J.T.M., Tavechio A.T. Fernandes S.A., Batista A.B., Castanheira I.A.Z., Garcia G.M.P. & Gelli D.S. 1995.** Outbreak of *Salmonella* Enteritidis in northwest of S. Paulo State, Brazil. *Revista de Saúde Pública*.29:127-131.

23 **Kanashiro A.M.I., Stoppa G.F.Z., Cardoso A.L.S.P., Tessari E.N.C. & Castro A.G.M. 2005.** Serovars of *Salmonella* spp. isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. *Brazilian Journal of Poultry Science*.7:195-198.

22 **Kimura A.K., Reddy V., Marcus R., Cieslak P.R., Mohle-Boetani J.C., Kassenborg H.D., Segler S.D., Hardnett F.P., Barrett T. & Swerdlow D.L. 2004.** Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. *Clinical Infectious Diseases*.38 (Suppl 3):244-252.

6 **Liebana E., Clouting C., Garcia-Migura L., Clifton-Hadley F.A., Lindsay E., Threlfall E.J. & Davies R.H. 2004.** Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. *Veterinary Microbiology*.100:189-195.

9 **Lindqvist N., Heinikainen S., Siitonen A. & Pelkonen S. 2004.** Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium DT1 isolates. *Epidemiology and Infection*.132:263-272.

35 **Lindstedt B., Heir E., Vardund T. & Kapperud G. 2000.** Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. *Journal of Clinical Microbiology*.38:1623-1627.

32 **Mamma C., Romani C., Giammanco G.M., Luzzi I., Dionisi A.M. & Nastasi A. 2006.** Single-enzyme- amplified polymorphism (SE-AFLP) in *Salmonella* epidemiology. In: *Proceedings of the International Symposium Salmonella and Salmonellosis* (Saint-Malo, France). pp.121-123.

14 **McLauchlin J., Ripabelli G., Brett M.M. & Threlfall E.J. 2000.** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *International Journal of Food Microbiology*. 56:21-28.

- 16 **Moreno A.M., Baccaro M.R., Ferreira A.J.P. & de Castro A.F.P. 2003.** Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs. *Journal of Clinical Microbiology*.41:1743-1746.
- 5 **Patrick M.E., Adcock P.M., Gomez T.M., Altekruze S.F., Holland B.H., Tauxe R.V. & Swerdlow D.L. 2004.** *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1995-1999. *Emerging Infectious Diseases*.10:1-7.
- 25 **Peresi J.T.M., Almeida I.A.Z.C., Lima S.I., Marques D.F., Rodrigues E.C.A., Fernandes S.A., Gelli D.S. & Irino K. 1998.** Food borne disease outbreaks caused by *Salmonella* Enteritidis. *Revista de Saúde Pública*.32:477-483.
- 10 **Peters T.M., Maguire C., Threlfall E.J., Fisher I.S.T., Gill N. & Gatto A.J. 2003.** The Salm-gene project: a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Euro Surveillance*.108:46-50.
- 18 **Peters T.M. & Threlfall E.J. 2001.** Single-enzyme amplified fragment length polymorphism and its applicability for *Salmonella* epidemiology. *Systematic and Applied Microbiology*.24:400-404.
- 28 **Rabsch W., Tschäpe H. & Bäumler A.J. 2001.** Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection*.3:237-247.

33 **Scott F., Threlfall J., Stanley J. & Arnold C. 2001.** Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella* Enteritidis: a method suitable for rapid outbreak recognition. *Clinical Microbiology and Infection*.7:479-485.

30 **Seo Y., Lee S., Shin E., Kim S., Jung R. & Hahn T. 2006.** Pulsed-field electrophoresis genotyping of *Salmonella gallinarum* and comparison with random amplified polymorphic DNA. *Veterinary Microbiology*.115:349-357.

19 **Sood S., Peters T., Ward L.R. & Threlfall E.J. 2002.** Combination of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP) for differentiation of multiresistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Clinical Microbiology and Infection*.8:154-161.

2 **Tavechio A.T., Fernandes S.A., Neves B.C., Dias A.M.G. & Irino K. 1996.** Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*.38:315-322.

1 **Threlfall E.J. & Chart H. 1993.** Interrelationships between strains of *Salmonella enteritidis*. *Epidemiology and Infection*.111:1-8.

12 **Valsangiacomo C., Baggi F., Gaia V., Balmelli T., Peduzzi R. & Piffaretti J. 1995.** Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella*

pneumophila and application to epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology*.33:1716-1719.

15 **van der Zee A., Steer N., Thijssen E., Nelson J., van't Veen A. & Buiting A. 2003.** Use of multienzyme multiplex PCR amplified fragment length polymorphism typing in analysis of outbreaks of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*.41:798-802.

13 **Vellappan N., Snodgrass J.L., Hakovirta J.R., Marrone B.L. & Burde S. 2001.** Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*.39: 77-83.

31 **Weigel R.M., Qiao B., Teferedegne B., Suh D.K., Barber D.A., Isaacson R.E. & White B.A. 2004.** Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. *Veterinary Microbiology*.100:205-217.

Table 1. Source, number of isolates tested, country of origin and SE-AFLP genotypes of the *Salmonella enterica* strains analyzed.

Serotype	Source	Number	Origin	SE-AFLP genotype
Enteritidis	Poultry meat	31	Brazil	HG1, HC1, HT1
Enteritidis	Broiler	22	Brazil	HG1, HC1 or HC2, HT1
Enteritidis	Swine	1	Brazil	HG3, HC3, HT3
Enteritidis	Humans	14	Brazil	HG1, HC1, HT1
Enteritidis	Food related to poultry	9	Brazil	HG1, HC1, HT1
Enteritidis	Food not-related to poultry	20	Brazil	HG1, HC1, HT1
Enteritidis	Unknown	1	Egypt	HG1, HC1, HT1
Enteritidis	Unknown	2	Italy	HG1, HC1, HT1 or HT2
Enteritidis	Unknown	2	Albania	HG1, HC1, HT1
Enteritidis	Unknown	2	Zimbabwe	HG1, HC1, HT1
Enteritidis	Unknown	2	Tanzania	HG1 or HG2, HC1, HT1
Typhimurium	Poultry	1	Brazil	HG4, HC4, HT4
Panama	Poultry	1	Brazil	HG5, HC5, HT5
Heidelberg	Poultry	1	Brazil	HG6, HC6, HT6
Senftenberg	Poultry	1	Brazil	HG7, HC7, HT7
Worthington	Poultry	1	Brazil	HG8, HC8, HT8
Orion	Poultry	1	Brazil	HG9, HC9, HT9
Infantis	Poultry	1	Brazil	HG10, HC10, HT10
Adelaide	Poultry	1	Brazil	HG11, HC11, HT11

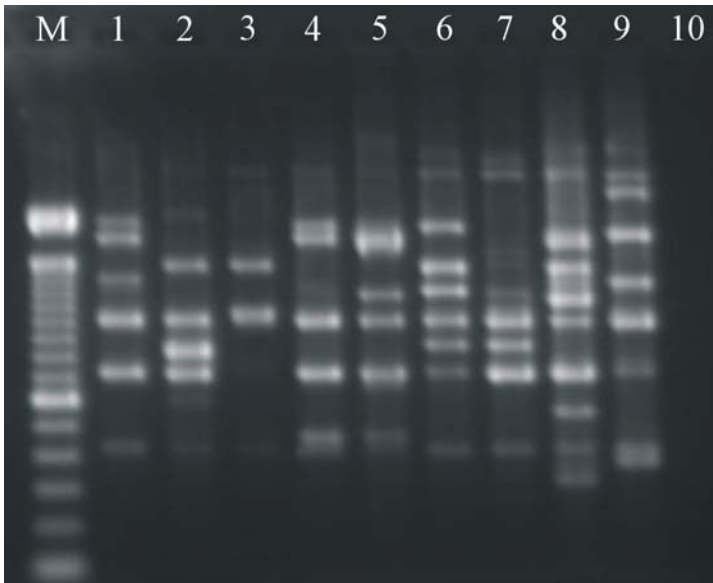


Figure 1: SE-AFLP patterns of the *Salmonella* serovars obtained with primer HI-C. Amplified PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide². M, molecular marker² (100-bp ladder); 1, *S. Enteritidis* ATCC 13076; 2-9, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg*, *S. Worthington*, *S. Orion*, *S. Infantis*, *S. Adelaide* and *S. Panama*, respectively; 10, PCR-negative control containing no template DNA.

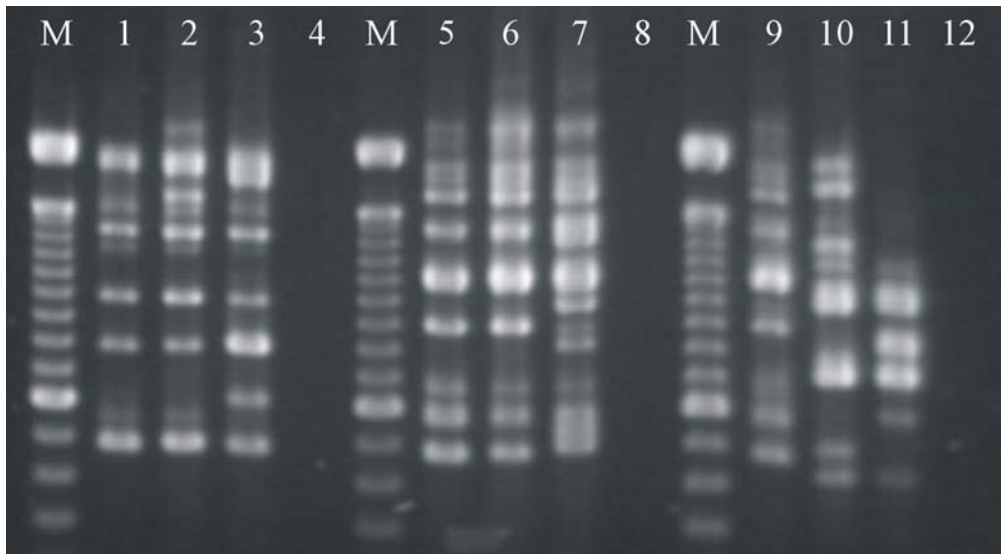


Figure 2: SE-AFLP patterns of the *S. Enteritidis* strains analyzed. Amplified PCR products were electrophoresed in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide². M, molecular marker² (100-bp ladder); 1-3, patterns obtained with primer HI-G; 5-7, patterns obtained with primer HI-T; 9-11, patterns obtained with primer HI-C; 4, 8 and 12, PCR-negative control containing no template DNA.

3.3 Análise do poder discriminatório da SE-AFLP para *Salmonella* Enteritidis frente a outras técnicas fenotípicas e genotípicas*

*Manuscrito aceito para publicação na forma de artigo original no periódico Acta Scientiae Veterinariae.

Análise do poder discriminatório da SE-AFLP para *Salmonella* Enteritidis frente a outras técnicas fenotípicas e genotípicas

André Felipe Streck¹, Clarissa Silveira Luiz Vaz¹, Fernanda Simone Marks¹, Sílvia Dias de Oliveira², Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso³, Cláudio Wageck Canal¹

1. Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/ RS.
2. Pontifícia Universidade Católica (PUCRS), Porto Alegre/ RS.
3. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, UFRGS, Porto Alegre/ RS.

CORRESPONDÊNCIA: C. W. Canal [claudio.canal@ufrgs.br ; Fax + (51) 3316 7305].

Resumo

Salmonella (*S.*) Enteritidis é uma das bactérias mais implicadas em casos de infecções alimentares e sua epidemiologia é investigada por diferentes métodos fenotípicos e genotípicos. Dentre as técnicas de tipificação de bactérias, a técnica de single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) é um dos métodos mais recentemente descritos, apresentando boa confiabilidade e fácil aplicação. No presente trabalho, a SE-AFLP foi comparada com as técnicas fenotípicas de fagotipificação (PT) e determinação da sensibilidade a antimicrobianos (DSA) e genotípicas de rep-PCR (seqüências repetitivas REP, ERIC e BOX) e detecção de genes de virulência (genes *spvR* e *spvC*). Foram analisadas 20 amostras de *S. Enteritidis*, sendo onze isoladas de suínos da Região Sul do Brasil e nove amostras oriundas de outros países. A caracterização destas amostras pelas técnicas de PT, DSA, presença de genes de virulência e rep-PCR foi descrita em um trabalho anterior. O poder discriminatório obtido pelas técnicas foi calculado pelo índice de diversidade de Simpson (*D*). A SE-AFLP encontrou um número maior de perfis e obteve uma maior capacidade discriminatória do que as outras técnicas genotípicas, embora seu *D* tenha sido menor do que o das técnicas fenotípicas. Desta forma, ficou demonstrada a importância da utilização conjunta de técnicas fenotípicas e genotípicas na caracterização de amostras de *S. Enteritidis*.

Descritores: *Salmonella* Enteritidis; SE-AFLP; Genotipagem; Suíno; Epidemiologia.

Abstract

Salmonella Enteritidis (SE) is one of the most reported bacteria in outbreaks of food borne disease and its epidemiology has been investigated by different phenotyping and genotyping based methods. Fingerprinting by SE-AFLP is one of the most recent methods, presenting easy application and reproducibility. In the present study, the SE-AFLP method was compared with two phenotyping techniques; phage typing (PT) and antimicrobial susceptibility (DSA) and two genotyping techniques; rep-PCR (repetitive sequences REP, ERIC and BOX) and detection of virulence genes (genes *spvR* and *spvC*). For these, 20 samples were analyzed, being eleven of swine origin from the Southern Region of Brazil and nine samples from other countries. The techniques of phage typing, DSA, presence of virulence genes and rep-PCR were performed in a previous study. For the accomplishment of the SE-AFLP, the technique was performed using the restriction enzyme *Hind* III. The discriminatory power obtained by the techniques was calculated by the Simpson's index of diversity (D). Between the genotypic based techniques, the SE-AFLP evidenced a higher number of profiles and obtained a best discriminatory capacity. However, the D was lower than both phenotypic based techniques. The results evidenced the importance of the combined use of phenotypic and genotypic techniques for *Salmonella* Enteritidis typing.

Key words: *Salmonella* Enteritidis; SE-AFLP; Genotyping; Swine; Epidemiology.

1. Introdução

A salmonelose é uma das zoonoses de maior importância no mundo devido a perdas econômicas causadas na produção animal e por sua implicação em saúde pública [27,28]. Dentre os mais de 2000 sorovares desta bactéria, o Enteritidis (*S. Enteritidis*), após a década de 90, passou a ser o mais isolado de alimentos de origem animal e surtos de infecção alimentar em seres humanos [2,17,23,25,27].

Medidas efetivas de controle da *S. Enteritidis* podem ser estabelecidas identificando sua fonte de contaminação e rastreando epidemiologicamente o isolado implicado dentro da cadeia produtiva animal. Tradicionalmente, esta investigação epidemiológica tem se baseado em características fenotípicas [10], porém, estas técnicas possuem algumas limitações. Nos últimos anos, o desenvolvimento da biologia molecular levou ao estabelecimento de novos métodos de tipagem baseados no genótipo de microrganismos [10]. Entre estas, um dos mais recentes métodos de tipificação por PCR, o *single-enzyme amplified fragment length polymorphism* (SE-AFLP), vem apresentando um ótimo potencial [7,22].

Baseado nisto, o objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade discriminatória da técnica de SE-AFLP para a caracterização de isolados de *S. Enteritidis*, comparando esta técnica com técnicas fenotípicas e outras técnicas genotípicas que haviam sido executadas em um trabalho anterior com estas mesmas amostras [20].

2. Materiais e métodos

Amostras utilizadas

Foram analisadas 20 amostras de *S. Enteritidis*, sendo onze oriundas de carne e derivados de suínos e nove isoladas de surtos de infecção alimentar em humanos. As amostras suinícolas foram coletadas na Região Sul do Brasil (Rio Grande do Sul e Santa Catarina) durante o período de 1995 a 2001. As amostras de humanos foram isoladas em outros países (Albânia, Egito, Itália, Tanzânia e Zimbábue), não havendo informação sobre o ano de isolamento. Todas as amostras utilizadas eram epidemiologicamente não-relacionadas e haviam sido previamente isoladas, sorotipificadas e fagotipificadas [5]. Como controle das técnicas moleculares, foi utilizada a amostra 13076 da *American type culture collection* (ATCC).

Determinação da sensibilidade a antimicrobianos, detecção de genes de virulência e rep-PCR

As técnicas de determinação da sensibilidade a antimicrobianos, detecção de genes de virulência e rep-PCR foram realizadas em trabalho anterior [20]. A DSA foi realizada conforme preconizado pelo NCCLS [18]. A sensibilidade das amostras foi testada frente aos seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico (30 mg), ampicilina (10 mg), cefalotina (30 mg), ciprofloxacina (5 mg), cloranfenicol (30 mg), gentamicina (10 mg), estreptomicina (10 mg), nitrofurantoína (300mg) norfloxacina (10 mg), tetraciclina (30 mg) e sulfonamida (300 mg). A detecção de genes de virulência foi realizada através de PCR, com iniciadores para os genes *spvR* e *spvC*. A técnica de rep-PCR foi realizada utilizando iniciadores para REP (REP1R-I e REP2-I), ERIC (ERIC1R e ERIC2) e BOX (BOX1R).

SE-AFLP

O método genotípico utilizado foi o SE-AFLP [7,22] modificado. Para avaliação desta técnica, o DNA total foi obtido de culturas incubadas por 24 h a 37°C, conforme protocolo anteriormente descrito [21]. Alíquotas contendo 4 µg de DNA foram clivadas com 2 U de *Hind* III¹, utilizando tampão específico da enzima, num volume final de 80 µL. A reação de ligação foi feita a 16°C, contendo 5 µL de DNA clivado, 0,2 µg de cada oligonucleotídeo adaptador², 1 U de T4 DNA ligase¹ e tampão específico da enzima, em um volume final de 20 µL. O DNA ligado foi precipitado e ressuspensão em 10 mM Tris-HCl pH 8,0 com 1 mM EDTA. Os fragmentos foram amplificados por PCR, onde foram utilizados quatro iniciadores que diferiram no último oligonucleotídeo da extremidade 3', sendo A, T, C ou G (referidos como iniciadores A, T, C e G). A PCR foi realizada utilizando-se 2,5 mM MgCl₂, 20 pmol de um único iniciador (A, T, C ou G) e 1 U de *Taq* DNA Polimerase. A eletroforese foi realizada em gel de agarose³ 1,5%. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,5 µg/mL) e visualizados em transluminador de luz ultra violeta. A SE-AFLP foi realizada com todas as amostras duas vezes.

Análise dos fragmentos

O poder discriminatório (*D*) foi determinado pelo Índice de Diversidade de Simpson, que calcula a probabilidade da técnica de tipagem assinalar como distintas duas amostras não relacionadas e randomicamente selecionadas de uma população [8].

3. Resultados

O número de produtos de amplificação por perfil variou de quatro a doze, situando-se entre 200 pares de bases (pb) e 2400 pb (Figura 1). Apenas as bandas situadas entre 200 pb e 1800 pb foram analisadas. Os iniciadores testados apresentaram um perfil predominante para a maioria das amostras (A1, C1, G1 e T1). Individualmente, foram obtidos dois perfis diferentes com o iniciador T, quatro perfis com os iniciadores A e G e cinco perfis com o iniciador C. Os perfis não predominantes incluíram apenas uma ou duas amostras. Os resultados desta técnica e sua relação com as demais técnicas estão expostos na Tabela 1.

Ao analisar o poder discriminatório pelo índice de Simpson, a SE-AFLP gerou o menor D com o iniciador T (0,19) e o maior com o C (0,37), com uma média do índice de Simpson obtido com os quatro iniciadores de 0,28. Comparando a SE-AFLP com outras técnicas genotípicas, rep-PCR e a presença de genes de virulência observa-se que houve um melhor poder de discriminação no grupo de amostras testadas. Por sua vez, as técnicas fenotípicas, fagotipificação e perfil de resistência a antimicrobianos, apresentaram D bastante superior à média obtida pela SE-AFLP.

4. Discussão

Nos últimos anos, a *S. Enteritidis* tem sido a principal causadora de doenças transmitidas por alimentos no Estado do Rio Grande do Sul, gerando gastos públicos com hospitalização e perdas de dias de trabalho [2,17]. Por outro lado, o Brasil, na qualidade de país exportador, sofre pressões comerciais para que seus produtos de origem animal estejam livres deste patógeno, gerando a necessidade da implementação de tecnologia para seu controle. Diversas técnicas fenotípicas e genotípicas vêm sendo empregadas para a caracterização epidemiológica deste patógeno [1,6,11,19]. Porém, nestes estudos, existem poucas abordagens que ofereçam uma análise comparativa entre um número mais amplo de técnicas.

No presente trabalho, examinamos uma coleção de *S. Enteritidis* de origem suína e humana, coletadas no período entre 1995 e 2001 através da execução da técnica de SE-AFLP. As técnicas de fagotipificação, determinação da sensibilidade a antimicrobianos, detecção de genes de virulência e rep-PCR, realizadas em estudo anterior com as mesmas amostras [20], foram utilizadas para comparação e fornecer suporte aos resultados obtidos com a SE-AFLP. Para realizar esta comparação, foi determinado o índice de diversidade de Simpson [8], que é frequentemente utilizado com esta finalidade [4,24].

A técnica de SE-AFLP apresentou um perfil que predominou na maioria das amostras com os quatro iniciadores (A1, C1, G1 e T1) testados. Além deste perfil predominante, também gerou alguns perfis distintos em algumas amostras com cada iniciador, resultando em quatro padrões com o iniciador A ou G, cinco com o C e apenas dois com o T. O valor de *D* obtido foi de 0,28, 0,37, 0,28 e 0,19 para os iniciadores A, C, G e T, respectivamente. Os métodos genotípicos de detecção de genes de virulência e rep-PCR também

apresentaram, com todos seus iniciadores, a presença de um perfil predominante (*spvR*: presença; *spvC*: presença; REP: R1; ERIC: E1 e BOX: B1). O valor de *D* apresentado pelos iniciadores *spvR* e *spvC* foi de 0,10 para ambos, enquanto que os iniciadores de rep-PCR, REP, ERIC e BOX, apresentaram *D* de 0,10, 0,00 e 0,19, respectivamente. Por sua vez, os métodos fenotípicos aplicados nestas amostras geraram um alto grau de diversidade. A DSA apresentou *D*=0,93 e a PT *D*=0,83. Ao todo, foram encontrados treze distintos perfis na técnica de DSA e seis perfis na técnica de PT, não sendo possível determinar a presença de um perfil predominante.

Os melhores resultados encontrados com a SE-AFLP frente às demais técnicas genotípicas referem-se, possivelmente, às diferenças de alvo das distintas técnicas. A rep-PCR baseia-se na amplificação de regiões entre seqüências repetitivas que se encontram esparsas no cromossomo bacteriano, sem função definida ou conhecida. Da mesma forma, a técnica de detecção de genes de virulência explora regiões gênicas específicas que, por sua importância para o patógeno, estão sujeitas a uma pequena variabilidade. A SE-AFLP, por sua vez, realiza uma análise indiscriminada em todo o cromossomo bacteriano, utilizando como alvo regiões que flanqueiam o sítio de clivagem de uma enzima de restrição (*Hind* III). Outra vantagem desta técnica sobre as demais é a utilização de quatro iniciadores (A, C, G e T), possibilitando encontrar um maior número de perfis, oriundos da diferença de um nucleotídeo na região de anelamento do iniciador, e podendo inclusive utilizar todos iniciadores em uma única reação de PCR [13]. Já a diversidade de perfis e o valor de *D* encontrados com as técnicas fenotípicas foram superiores inclusive à técnica de SE-AFLP. Entretanto, a expressão de um caráter fenotípico é suscetível de modificar-se quando as condições ambientais variarem, sendo, portanto, menos estável que o perfil genotípico [3].

A técnica de AFLP é um dos mais recentes métodos de tipagem molecular descritos [10] e vem sendo utilizada para o estudo epidemiológico de diversas bactérias [15,16,29,30]. Dentre as diferentes formas de realização da técnica de AFLP [9,14,29,32], a SE-AFLP é uma modificação da técnica que tem apresentado resultados confiáveis [7,22]. Como vantagens sobre a AFLP, é uma técnica mais simples de executar, e o fato de sua eletroforese poder ser realizada em gel de agarose proporciona sua aplicação em laboratórios de pequeno porte. Outra vantagem é que, por utilizar apenas uma enzima de restrição, a SE-AFLP gera padrões de bandas menos complexos que a AFLP, podendo ser interpretada sem o auxílio de programas específicos. Pelo seu custo mais acessível, facilidade de execução e interpretação de resultados, a SE-AFLP já foi considerada uma boa alternativa inclusive ao uso do PFGE, técnica padrão-ouro em tipagem atualmente [12,13].

Estudos recentes utilizando a SE-AFLP para caracterização de *S. Enteritidis* também verificaram a presença de boa capacidade discriminatória. Em estudo envolvendo amostras de *S. Enteritidis* de origem avícola, a SE-AFLP também gerou um perfil predominante, porém, conseguiu diferenciar todos os sorovares testados [31]. Ao analisar 172 isolados de *S. Enteritidis* de distintas origens, a técnica de SE-AFLP foi capaz de obter 12 distintos perfis [13], demonstrando possuir bom poder discriminatório.

No presente trabalho, a técnica de SE-AFLP obteve resultados superiores aos encontrados com as técnicas genotípicas que haviam sido empregadas anteriormente. Entretanto, os presentes resultados também indicam que as técnicas genotípicas testadas apresentaram uma capacidade discriminatória limitada para isolados de *S. Enteritidis* epidemiologicamente não relacionados, confirmando o caráter clonal atribuído ao sorovar *Enteritidis* [23]. Por isto, a utilização da técnica de SE-AFLP como método único de

tipagem para *S. Enteritidis* não deve ser recomendada. A partir disso, as técnicas de determinação da sensibilidade a antimicrobianos e fagotipificação devem ser associadas para uma melhor discriminação das amostras em estudos epidemiológicos. Da mesma forma, outras técnicas genotípicas devem ser testadas para alcançar um índice de discriminação mais adequado.

5. Conclusão

A técnica de SE-AFLP mostrou um maior poder discriminatório, no grupo de isolados de *Salmonella* Enteritidis originário de surtos de infecção alimentar em humanos e produtos de suínos, do que a rep-PCRe a detecção de genes de *spv*. Dentre os iniciadores testados, o iniciador C gerou os melhores resultados. Entretanto, a discriminação alcançada foi inferior ao das técnicas fenotípicas (fagotipificação e perfil de resistência a antimicrobianos), tornando indispensável a associação de técnicas fenotípicas com a SE-AFLP para uma melhor caracterização de amostras de *S. Enteritidis*.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq – Brasil, que apoiou o presente trabalho e forneceu bolsa aos autores A.F. Streck e C.S.L. Vaz.

Notas informativas

1. Fermentas, EUA.
2. Invitrogen, Brasil.
3. Gibco, Brasil.

Referências

- 1 **Betancor L., Schelotto F., Martínez A., Pereira M., Algorta G., Rodríguez M.A., Vignoli R. & Chabalgoity, J.A. 2004.** Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. 2004. *Journal of Clinical Microbiology*. 42: 1155-1162.
- 2 **Costalunga S. & Tondo E.C. 2002.** Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brasil, 1997 to 1999. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 342-346.
- 3 **Fernandez-Cuenca F. 2004.** Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 22:355-360.
- 4 **de la Puente-Redondo V.A., Garcia del Blanco N., Guetiérrez-Martim C.B, Garcia-Pena F.J. & Rodríguez Ferri E.F. 2000.** Comparison of different PCR approaches for typing of *Francisella tularensis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 1016-1022.
- 5 **dos Santos L.R., Nascimento V.P., de Oliveira S.D., Rodrigues D.P., dos Reis E.M.F., Seki L.M., Ribeiro A.R. & Fernandes S.A. 2003.** Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 45: 1-4.

- 6 **Geimba M.P., Tondo E.C., de Oliveira F.A., Canal C.W. & Brandelli A. 2004.** Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *Journal of Food Protection*. 67: 1229-1233.
- 7 **Gibson J.R., Slater E., Xerry J., Tompkins D.S. & Owen R.J. 1998.** Use of amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprinting and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology*. 36: 2580-2585.
- 8 **Hunter P.R. 1990.** Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*. 28: 1903-1905.
- 9 **Janssen P., Coopman R., Huys G., Swings J., Blecker M., Vos P., Zabeau M. & Kerster K. 1996.** Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology*. 142: 1881-1893.
- 10 **Liebana E. 2002.** Molecular tools for epidemiological investigations of *S. enterica* subspecies *enterica* infections. *Research in Veterinary Science*. 72: 169-175.
- 11 **López-Molina N., Laconcha I., Rementeria A., Audicana A., Perales I. & Garaizar J. 1998.** Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types of PCR fingerprinting. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 877-882.

- 12 **Mamma C., Giammanco G.M., Romani C., Nastasi A. 2005.** Use of pulsed field gel electrophoresis (PFGE) and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SE-AFLP) to subtype isolates of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Italian Journal of Public Health*. 2: 23-28.
- 13 **Mamma C., Romani C., Giammanco G.M., Luzzi I., Dionisi A.M. & Nastasi A. 2006.** Single-enzyme- amplified polymorphism (SE-AFLP) in *Salmonella* epidemiology. In: *Proceedings of the International Symposium Salmonella and Salmonellosis* (Saint-Malo, France). pp.121-123.
- 14 **Mazurak G., Reddy H.V., Marston B.J., Haas W.J. & Crawford J.T. 1996.** DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 34: 2386-2390.
- 15 **McLauchlin J., Ripabelli G., Brett M.M. & Threlfall E.J. 2000.** Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. *International Journal of Food Microbiology*. 56: 21-28.
- 16 **Moreno A.M., Baccaro M.R., Ferreira A.J.P. & de Castro A.F.P. 2003.** Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 1743-1746.

- 17 **Nadvorny A., Figueiredo D.M.S. & Schmidt V. 2004.** Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32: 47-51.
- 18 **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2001.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *11th informational supplement*. Wayne (Approved standard M2-A7 and M7-A5). PA.
- 19 **Nunes I.A., Helmuth R., Schroeder A., Mead G.C., Santos M.A., Solari C.A., Silva O.R. & Ferreira A.J. 2003.** Phage typing of *Salmonella enteritidis* from different sources in Brazil. *Journal of Food Protection*. 66: 324-327.
- 20 **Oliveira S.D. 2003.** Detecção de *Salmonella* sp. e caracterização de isolados de *Salmonella* Enteritidis pela presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e por rep-PCR fingerprinting. 122 p. Porto Alegre. RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 21 **Oliveira S.D., Rodenbusch C.R., Ce M.C., Rocha S.L.S. & Canal C.W. 2003.** Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. 36: 217-221.

- 22 **Peters T.M. & Threfall E.J. 2001.** Single-enzyme amplified fragment length polymorphism and its applicability for *Salmonella* epidemiology. *Systematic and Applied Microbiology*. 24: 400-404.
- 23 **Rodrigue D.C., Tauxe R.V. & Rowe B. 1990.** International increase in *Salmonella enteritidis*: A new pandemic? *Epidemiology and Infections*. 105: 21-27.
- 24 **Talon D., Cailleaux V., Thouverez M., Michel-Briand Y. 1996.** Discriminatory power and usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in epidemiological studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of hospital infections*. 32:135-145.
- 25 **Taunay A.E., Fernandez S.A., Tavechio A.T., Neves B.C., Dias A.M.G. & Irino K. 1996.** The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 38: 119-127.
- 26 **Tavechio A.T., Fernandez S.A., Nevez B.C., Dias A.M.G. & Irino K. 1996.** Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 38: 315-322.
- 27 **Thong K.L., Ngeow Y.F., Altwegg M., Navaratnam P. & Pang T. 1995.** Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 1070-1074.

- 28 **Tortora G.J., Funke B.R. & Case C.L. 2000.** Microbiologia. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 827 p.
- 29 **Valsangiocomo C., Baggi F., Gaia V., Balmelli T., Peduzzi R. & Piffaretti J. 1995.** Use of amplified length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: 1716-1719.
- 30 **van der Zee A., Steer N., Thijssen E., Nelson J., van't Veen A. & Buiting A. 2003.** Use of multienzyme multiplex PCR amplified fragment length polymorphism typing in analysis of outbreaks of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 41: 798-802.
- 31 **Vaz C.S.L., Streck A.F., Tramontina T., Cardoso M.R.I., Canal C.W. 2007.** Use of a modified AFLP protocol to discriminate *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. *Acta Scientiae Veterinariae*. In press.
- 32 **Vos P., Hoger R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. 1995.** AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414.

Tabela 1. País e origem das amostras analisadas, juntamente com o fagotipo (PT), determinação da sensibilidade a antimicrobianos (DSA)*, perfil de REP, ERIC e BOX-PCR, presença de genes de virulência (*spvR* e *spvC*) e perfil obtido pelos diferentes iniciadores utilizados na técnica de SE-AFLP (A, C, G ou T).

Núm	País	PT	DSA*	REP	ERIC	BOX	<i>SpvR</i>	<i>SpvC</i>	AFLPa	AFLPc	AFLPg	AFLPt
01	Brasil	Nd.	Str, Nalx	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
02	Brasil	6a	Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
03	Brasil	6	Smx, Str, Nit, Ampe	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
04	Brasil	6a	Str, Tet, Gen, Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
05	Brasil	6a	Smx, Str, Tet, Gen	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
06	Brasil	Nd.	Smx, Nit	R1	E1	B1	+	+	A2	C2	G2	T2
07	Brasil	6a	Str, Tet, Gen, Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
08	Brasil	Nd.	Chl, Smx, Tet, Nit, Nalx	R1	E1	B2	-	-	A3	C3	G3	T2
09	Brasil	7a	Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
10	Brasil	6a	Str, Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
11	Brasil	Nd.	Gen, Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
12	Tanzânia	4	Smx	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
13	Zimbábue	4	-	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
14	Itália	11	Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
15	Egito	4	Smx, Str, Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
16	Albânia	6	Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
17	Itália	11	Nit	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
18	Tanzânia	9	Chl, Smx, Str, Ampe	R2	E1	B3	+	+	A4	C4	G4	T1
19	Albânia	6	-	R1	E1	B1	+	+	A1	C1	G1	T1
20	Zimbábue	4	Smx	R1	E1	B1	+	+	A1	C5	G1	T1
21	ATCC**	Nd.	-	R1	E2	B1	+	-	A1	C1	G1	T1
<i>D</i> **		0,83	0,93	0,10	0,00	0,19	0,10	0,10	0,28	0,37	0,28	0,19

* ácido nalidíxico (Nalx), ampicilina (Ampe), cefalotina (Cef), ciprofloxacina (Cipx), cloranfenicol (Chl), estreptomicina (Str), gentamicina (Gen), nitrofurantoína (Nit), norfloxacina (Nor), tetraciclina (Tet) e sulfonamida (Smx).

** A amostra ATCC 13076 não foi considerada no cálculo de *D*.

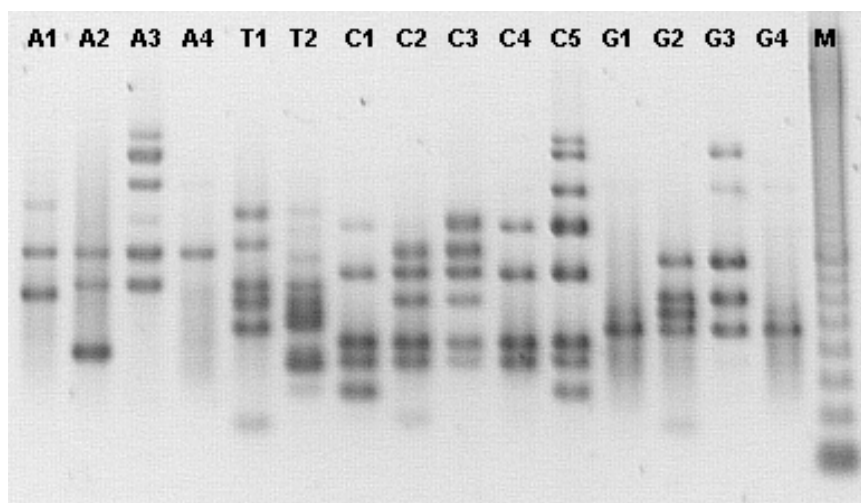


Figura 1: Visualização da eletroforese realizada em gel de agarose 1,5% dos produtos da SE-AFLP, com os perfis distintos obtidos com os iniciadores A (A1, A2, A3 e A4), T (T1 e T2), C (C1, C2, C3, C4 e C5) e G (G1, G2, G3 e G4). M: marcador molecular de 100 pb.

3.4 Características genóticas e fenóticas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul*

*Dados preliminares. Manuscrito em fase de redação, a ser submetido a periódico científico.

Características genotípicas e fenotípicas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul

Clarissa Silveira Luiz Vaz¹, André Felipe Streck¹, Tatiana Tramontina², Dália dos Prazeres Rodrigues³, Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso⁴, Cláudio Wageck Canal^{1*}

¹Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária UFRGS. Porto Alegre, RS.

²Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (IPB/LACEN-RS), Porto Alegre, RS.

³Laboratório de Enteroinfecções Bacterianas, Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

⁴laboratório de Medicina Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS.

*Autor para correspondência (C.W. Canal, e-mail: claudio.canal@ufrgs.br / 51 3316 6926).

1. Introdução

Salmonella enterica sorovar Enteritidis é um dos principais gêneros de bactérias envolvidos em doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul [1]. No Brasil, sua incidência vem sendo registrada desde 1993, quando passou a ser o sorovar de *Salmonella* mais isolado nos casos de intoxicação alimentar pelo consumo de alimentos [2]. O envolvimento de produtos de origem aviária na transmissão do patógeno aos consumidores [3-5] tem direcionado uma série de medidas de controle do patógeno dentro da indústria. Pela complexidade da cadeia de fornecimento dos alimentos, devem ser adotados métodos que permitam o rastreamento do patógeno dentro da cadeia alimentar, possibilitando o retorno à sua origem, uma etapa essencial na investigação epidemiológica de surtos ou de casos esporádicos [6,7]. Portanto, o sucesso dos programas de controle está associado à vigilância epidemiológica, através da identificação de fontes de infecção e das rotas de transmissão. Portanto, métodos que apresentem alta capacidade de discriminação são utilizados na subtipificação das linhagens e frequentemente somente a associação de diferentes metodologias permite a adequada caracterização de *S. Enteritidis* [8-11]. O presente estudo teve como objetivo investigar a relação fenotípica e genotípica de linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de aves e produtos relacionados, além de alimentos e pacientes envolvidos em surtos de salmonelose no Rio Grande do Sul. Para verificar a capacidade de discriminação das técnicas utilizadas, foram ainda analisadas amostras não relacionadas obtidas de suíno, além de linhagens isoladas em outros países.

2. Material e métodos

2.1 Linhagens de bactérias

Foram analisadas 115 linhagens de *S. enterica*, sendo 107 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de aves e fontes relacionadas, de suíno, e de alimentos e pacientes envolvidos em surtos de salmonelose. As linhagens foram obtidas no período entre 1995 e 2003 na região Sul do Brasil (Tabela 1). *S. Enteritidis* isoladas de alimentos e pacientes envolvidos em surtos foram cedidas pelo Serviço de Vigilância Epidemiológica no Rio Grande do Sul (FEPPS, IPB, LACEN/RS). Nove linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de fontes e datas desconhecidas em outros países, além de uma amostra de referência (ATCC 13076) foram também analisadas. Uma amostra de cada um dos oito diferentes sorovares de *S. enterica* isolados na mesma região do Brasil foram incluídos, sendo *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Panama*, *S. Senftenberg*, *S. Worthington*, *S. Orion*, *S. Infantis* e *S. Adelaide*.

2.2 Teste de suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade de *S. Enteritidis* foi investigada frente a onze diferentes antimicrobianos, os quais foram selecionados por representarem as principais classes utilizadas no tratamento de pacientes. O teste de difusão em agar foi realizado conforme preconizado pelo NCCLS [12]. Todas as linhagens foram analisadas frente aos seguintes antimicrobianos (Sensifar, Brasil): ampicilina (A, 10 µg), cefaclor (30 µg), ceftazidima (30 µg), ácido nalidíxico (Na, 30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (Clo, 30 µg), gentamicina (G, 10 µg), neomicina (30 µg), estreptomicina (Es, 10 µg), tetraciclina (T, 30 µg), sulfonamidas (Su, 300 µg) e trimetoprim-sulfamethoxazol (Sut, 25 µg). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle dos antibiogramas realizados.

2.3 Fagotipificação

A fagotipificação foi realizada na Fundação Instituto Oswaldo Cruz (RJ), utilizando metodologia previamente proposta [13].

2.4 Análise de macrorestrição de DNA

O DNA total foi obtido conforme previamente descrito [14]. Blocos de agarose contendo o DNA foram incubados durante 12 h na presença de 20 U de *Xba*I (Fermentas Life Sciences, Hanover, USA). A eletroforese em campo pulsado foi realizada de acordo com protocolo descrito em estudo anterior [15], sendo os fragmentos de DNA separados em um sistema CHEF-DR II (BioRad, Brasil) em gel de agarose 1% (PFGE certified, BioRad, Brasil) utilizando TBE 0.5X como tampão, durante um período de 22 h a 6 V/cm. O tempo de pulso aumentou de 2 até 64 s. O DNA de *Salmonella* Typhimurium LT2 DNA [16] foi obtido e sendo incubado com *Xba*I do mesmo modo como descrito, sendo utilizado como marcador de tamanho molecular. Após a eletroforese, o gel de agarose foi corado com brometo de etídeo (1 µg/ml, Invitrogen, USA) e registrado por um sistema de captura digital (UltraLum, Paramount, CA, USA). Os padrões de macrorestrição foram comparados pelo software NTSYS versão 1.8 (Applied Biostatistics, New York). A similaridade foi determinada pelo coeficiente de Dice, sendo o dendrograma obtido por UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*).

2.5 SE-AFLP

As culturas de bactérias foram multiplicadas em caldo BHI incubado *overnight* a

37°C. O DNA total foi obtido por tratamento com CTAB (*cetyltrimethylammonium bromide*) [17]. O DNA foi precipitado e resuspendido em 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) sendo a concentração e a qualidade determinadas pela leitura da absorvância a 260 e 280 nm. Uma alíquota contendo 4 µg de DNA foi submetida a restrição com 2 U de *HindIII* (Fermentas Life Sciences, USA) em Tris-HCl 10 mM pH 8.5, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, BSA 0.1 mg/mL, num volume final de 50 µL, a 37°C durante 3 h. Os fragmentos de DNA foram precipitados e ressuspenso em TE. Uma alíquota contendo 5 µL do DNA clivado foi utilizada na reação de ligação contendo 1 U of T4 DNA ligase (Fermentas Life Sciences, USA), tampão (Tris-HCl 40 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 0.5 mM, pH 7.8) e 0.2 µg de cada oligonucleotídeo adaptador (Invitrogen, USA) [18] num volume final de 20 µL incubado a 16°C durante 4 h. O DNA ligado foi precipitado com acetato de amônio 2.5 mM, sendo lavado com etanol 70% e ressuspenso em 50 µL de TE. As reações de PCR foram realizadas num termociclador GeneAmp 2400 (Applied Biosystems, USA). Em cada reação de PCR, foram utilizados separadamente três diferentes *primers* (Invitrogen, USA) [18], os quais foram complementares à sequência dos adaptadores, diferindo na base da extremidade 3', sendo G, T, ou C. Estes *primers* foram denominados HI-G, HI-T, e HI-C, respectivamente. Cada reação de PCR conteve o tampão de reação (KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 8.0), MgCl₂ 2.5 mM (nas reações com os *primers* HI-T ou HI-C), ou 3.0 mM (nas reações com o *primer* HI-G) (CenBiot, Porto Alegre, Brasil), 20 pmol de um único *primer*, 200 µM de cada dNTP (Ge Healthcare, USA), 1 U de *Taq* DNA polimerase (CenBiot, Porto Alegre, Brasil), 5 µL do DNA previamente ligado, e água destilada num volume final de 25 µL. O DNA foi amplificado nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C durante 4 min, seguido de 36 ciclos de

94°C por 1 min, 57°C durante 1 min e 72°C por 2.5 min. Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 1.5% (Invitrogen, USA) em tampão TBE (Tris-borato 0.045 M, EDTA 0.001M). Após a eletroforese, o gel foi corado por brometo de etídeo (0.5 µg/mL) (Invitrogen, USA) e registrado por um sistema de captura digital (UltraLum, Paramount, CA, USA). As reações de PCR foram repetidas para verificar a reprodutibilidade dos padrões de SE-AFLP.

3. Resultados e discussão

Nos resultados preliminares apresentados no presente trabalho, linhagens de *S. Enteritidis* foram subtipificadas pelo perfil de macrorestrição do DNA, SE-AFLP e resistência a antimicrobianos, sendo os resultados da fagotipificação não disponibilizados até o momento. PFGE tem sido o método de escolha para a caracterização de *S. Enteritidis* [15]. Contudo, o patógeno apresenta natureza clonal, de forma que a associação de técnicas com boa capacidade de discriminação tem possibilitado sua caracterização [8-11]. Neste trabalho, foi utilizada a associação da técnica de PFGE com SE-AFLP, a qual apresenta um custo financeiro mais acessível, além da caracterização fenotípica pelo padrão de resistência a antimicrobianos.

A análise por PFGE identificou 12 diferentes perfis de macrorestrição, sendo o genótipo mais prevalente o X1, encontrado em 79,4% dos isolados, incluindo amostras obtidas de aves, alimentos, humanos e em algumas das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas em outros países. A tipificação por SE-AFLP identificou três diferentes padrões com cada um dos *primers* utilizados (Tabela 1). Um padrão principal (H-G1, H-T1 e H-1) foi encontrado na maioria das amostras analisadas, incluindo a amostra de referência (*S. Enteritidis* ATCC 13076). Padrões alternativos foram identificados em uma amostra isolada na Tanzânia (H-G2), da Itália (H-T 2) e de ave (H-C2). No entanto a associação de ambas as metodologias aumentou a caracterização de *S. Enteritidis*. Por outro lado, na análise por SE-AFLP somente uma amostra de origem suína apresentou padrões alternativos com cada um dos *primers* utilizados.

Das 107 linhagens de *S. Enteritidis* analisadas, 55,1% apresentaram resistência a pelo menos um e até três dos antimicrobianos testados. Nenhuma linhagem apresentou resistência frente a cefaclor, ceftazidima, ciprofloxacina e neomicina. No total, foram

identificados 13 diferentes perfis de resistência a antimicrobianos (Tabela 1), do qual os mais freqüentes foram S (sensibilidade a todos os antimicrobianos testados) (45%), Su (20,6%) e Sut (11,2%).

Os perfis alternativos de SE-AFLP corresponderam a perfis alternativos também de PFGE, e uma vez que algumas linhagens de *S. Enteritidis* que apresentaram um padrão predominante de SE-AFLP puderam ser subtipificadas por PFGE, sugere-se que esta técnica tenha uma maior capacidade de discriminação. Por outro lado, a associação de ambos os genótipos aumenta a discriminação de *S. Enteritidis*, recomendando seu uso em associação para a análise de bactérias com caráter clonal. O uso de enzimas de restrição alternativas a *XbaI* vem sendo proposto na análise de *S. Enteritidis* [19], e podem aumentar a capacidade de discriminação da metodologia, embora dificultem a comparação dos padrões de macrorestrição por *XbaI* nos bancos de dados de programas que utilizam este protocolo.

Embora alguns dos genótipos alternativos tenham sido característicos de determinados grupos de amostras, diferentes perfis de resistência foram encontrados. Diferenças na sensibilidade a antimicrobianos podem ser causadas por eventos como a aquisição de plasmídeos, os quais podem ser incapazes de alterar o genótipo [20]. Do mesmo modo, diferenças na pressão seletiva entre granjas podem estimular a emergência de linhagens resistentes, as quais podem ser utilizadas para a caracterização das amostras [21].

Os resultados parciais deste trabalho sugerem que há um genótipo dominante presente nas amostras de origem animal, de alimentos e de humanos envolvidos em surtos de salmonelose. Portanto, provavelmente existe uma origem comum, indicando que pode haver uma relação na transmissão de *S. Enteritidis* entre os grupos analisados.

Referências

1. COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.342-346, 2002.
2. TAVECHIO, A.T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.5, p.315-322, 1996.
3. PATRICK, M.E. et al. *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1995-1999. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.1, p.1- 7, 2004.
4. GILLESPIE, I.A. et al. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks? **Epidemiology and Infection**, v.133, n.5, p.795-801, 2005.
5. KIMURA, A.K. et al. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.244-252, 2004.
6. O'BRIEN, S.J.; de VALK, H. *Salmonella*- "old" organism, continued challenges. **Eurosurveillance**, n.2, v.8, p.29-31, 2003.
7. OLSEN, J.E. et al. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.826-835, 2003.
8. LIÉBANA, E. et al. Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.189-195, 2004.

9. LINDQVIST, N. et al. Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium DT1 isolates. **Epidemiology and Infection**, v.132, p.263-272, 2004.
10. HUDSON, C.R. et al. Determination of close genetic relatedness of the major *Salmonella enteritidis* phage types by pulsed-field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several *Salmonella* virulence genes. **Avian Diseases**, v.45, p.875-886, 2001.
11. SEO Y. et al. Pulsed-field electrophoresis genotyping of *Salmonella gallinarum* and comparison with random amplified polymorphic DNA. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.349-357, 2006.
12. **National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals, second ed. Approved Standard M31-A2. Wayne, PA: NCCLS; 2002.
13. WARD, L.R.; de SA, J.D., ROWE, B. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. **Epidemiology and Infection**, v.99, n.2, p.291-294. 1987.
14. OLSEN, J.E. et al. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, p.15-22, 1994.
15. PETERS, T.M. et al. The Salm-gene project- a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. **Euro Surveillance**, v.108, p.46-50, 2003.
16. LIU, S.L.; HESSEL, A.; SANDERSON, K.E. The *XbaI-BlnI-CeuI* genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2 determined by double digestion, end labelling and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v.175, p.4104-4120, 1993.

17. AUSBEL, F.M. et al. 1999. **Short protocols in molecular biology**. 4th edn. New York: Wiley, 1104p.
18. GIBSON, J.R. et al. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.2580-2585, 1998.
19. FERNANDEZ, J. et al. Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1617-1622, 2003.
20. CARDINALE, E. et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.968-977, 2005.
21. ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: ARBEIT, R.D. **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed., 2001. p.116-137.

TABELA 1: Origem, número de linhagens analisadas, padrões de PFGE, SE-AFLP e resistência a antimicrobianos identificados em *S. Enteritidis*.

Origem das amostras	Nº	PFGE (nº de isolados)	SE-AFLP (nº de isolados)	Atm (nº de isolados)
Alimentos relacionados a aves	9	X1(7)/ X2(1)/ X7(1)	H-G1(9)/ H-T1(9)/ H-C1(9)	S(7)/ Su(2)
Alimentos não relacionados a aves	20	X1(16)/ X2(1)/ X5(2)/ X6(1)	H-G1(20)/ H-T1(20)/ H-C1(20)	S(9)/ Su(9)/ Sut(2)
Humanos	10	X1(10)	H-G1(10)/ H-T1(10)/ H-C1(10)	S(7)/ Su(1)/ Sut(1)/ T Su Sut (1)
Manipuladores de alimentos	4	X1(4)	H-G1(4)/ H-T1(4)/ H-C1(4)	S(4)
Carcças de frango	20	X1(18)/ X2(1)/ X3(1)	H-G1(20)/ H-T1(20)/ H-C1(20)	S(8)/ Su(6)/ Sut(5)/ Na(1)
Carne de frango	11	X1(8)/ X9(3)	H-G1(11)/ H-T1(11)/ H-C1(11)	S(3)/ Su Sut(2)/ Sut(2)/ Na Su(1)/ Na Sut(2)/ Na(1)
Vísceras de aves	19	X1(13)/ X2(3)/ X4(1)/ X9(2)	H-G1(19)/ H-T1(19)/ H-C1 (18)/ H-C2(1)	S(4)/ Su(1)/ Sut(5)/ Na S(3)/ Na Sut(1)/ Na S Sut(1)/ Na(2)/ Es G Sut(1)/ Es Su(1)
Ambiental	3	X1(3)	H-G1(3)/ H-T1(3)/ H-C1(3)	S(1)/ Na Su(1)/ Na(1)
Suíno	1	X12 (1)	H-G3(1)/ H-T3(1)/ H-C3(1)	A T(1)
Zimbábue	2	X1(2)	H-G1(2)/ H-T1(2)/ H-C1(2)	S(2)
Egito	1	X1(1)	H-G1(1)/ H-T1(1)/ H-C1(1)	Su(1)
Tanzânia	2	X1(1)/ X13(1)	H-G1(1)/ H-G2(1)/ H-T1(2)/ HI-1(2)	S(1)/ A Clo E T Su Sut(1)
Itália	2	X11(2)	H-G1(2)/ H-T1(1)/ H-T2(1)/ HI-1(2)	S(2)
Albânia	2	X1(2)	H-G1(2)/ H-T1(2)/ H-C1(2)	Su(2)
ATCC 13076	1	X8(1)	H-G1(1)/ H-T1(1)/ H-C1(1)	S(1)

S, totalmente sensível; Su, sulfonamidas; Sut, sulfonamidas e trimetoprim, T, tetraciclina; Na, ácido nalidíxico; Es, estreptomicina; G, gentamicina; A, ampicilina; Clo, cloranfenicol.

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho foi analisada a diversidade de linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Rio Grande do Sul por diferentes metodologias. Pela incidência de *S. Enteritidis* em produtos de origem aviária e seu envolvimento em surtos de intoxicação alimentar pelo consumo de alimentos contaminados (DOYLE & CLIVER, 1990; OLSEN et al., 2001; KIMURA et al., 2004; KANASHIRO et al., 2005), o estudo foi concentrado em linhagens isoladas de aves, além de alimentos e pacientes envolvidos em surtos de salmonelose no Estado. *S. Enteritidis* isoladas em outros países, além de linhagens de origem suína, foram incluídas na análise por representarem origem geográfica e fonte, respectivamente, bastante distintas, auxiliando na avaliação da capacidade de discriminação das técnicas de tipificação utilizadas.

Considerando a implicação de *S. Enteritidis* em saúde pública e a possibilidade de transmissão de linhagens resistentes a antimicrobianos através da cadeia alimentar (MOLBAK, 2004), num primeiro estudo foi analisada a resistência a antimicrobianos e a diversidade genotípica em linhagens isoladas de material de origem aviária, além de alimentos e pacientes envolvidos em surtos de salmonelose no Rio Grande do Sul. Foram identificados onze diferentes padrões de resistência, incluindo a total sensibilidade aos antimicrobianos testados.

As amostras isoladas de aves, de humanos e de alimentos apresentaram percentuais de resistência a pelo menos um e no máximo três dos antimicrobianos testados, sendo 69,81%, 28,57% e 44,83%, respectivamente. De fato, até recentemente *S. Enteritidis* apresentava-se sensível à maioria dos antimicrobianos testados (MOLBAK et al., 2002). Mais recentemente, diferentes níveis de resistência vêm sendo identificados em linhagens isoladas de diferentes fontes e países (CARRAMIÑANA et al., 2004; BUSANI et al., 2004; de OLIVEIRA et al., 2005; ZAID et al., 2006), concordando com os resultados deste estudo.

Com exceção da resistência à associação sulfonamida e trimetoprima, encontrada em duas linhagens isoladas de aves, duas de humanos e duas de alimentos, não foi encontrada resistência aos demais antimicrobianos testados que têm importância médica. Segundo Angulo et al. (2000) e Threlfall (2002), a associação sulfonamida e trimetoprima, além de

ampicilina, cloranfenicol, fluoroquinolonas e cefalosporinas representam as classes normalmente utilizadas em pacientes hospitalizados devido à infecção por salmonelas, cujas complicações requerem terapia com antimicrobianos.

Por outro lado, este estudo identificou resistência a ácido nalidíxico em amostras de origem aviária, o que pode sugerir a emergência de linhagens resistentes devido à utilização deste antimicrobiano na produção animal. Existe uma tendência ao surgimento de linhagens resistentes a quinolonas que apresentam também redução da sensibilidade às fluoroquinolonas (ENDTZ et al., 1991; MALORNY et al., 1999; AARESTRUP et al., 2003). A ocorrência de resistência a ácido nalidíxico em *S. Enteritidis* de origem animal vem sendo também identificada em diferentes países (BUSANI et al., 2004; CARRAMIÑANA et al., 2004; de OLIVEIRA et al., 2005; ZAID et al., 2006), reforçando a recomendação de que o uso na avicultura deve ser realizado com critérios consistentes. Estes critérios devem de fato ser estendidos à utilização de qualquer classe de antimicrobianos, visto que neste estudo, a resistência encontrada nas amostras isoladas de aves foi significativamente maior do que a identificada em amostras isoladas de pacientes acometidos por salmonelose.

Neste mesmo estudo, as linhagens de *S. Enteritidis* foram analisadas também por PFGE, buscando investigar a relação entre as amostras isoladas de diferentes fontes. Foram identificados oito perfis de PFGE, cuja relação foi muito próxima. Foi possível verificar que o genótipo predominante, X1, está distribuído tanto entre aves, quanto entre alimentos e pacientes envolvidos em surtos. Os resultados de PFGE sugerem que as linhagens de *S. Enteritidis* são altamente conservadas, embora alguns perfis alternativos ao X1 possam representar genótipos emergentes desta linha clonal, como o padrão X8, identificado somente em linhagens isoladas de aves de uma mesma empresa avícola no mesmo ano.

Um perfil alternativo, X5, foi característico de duas linhagens isoladas de surtos não relacionados, as quais compartilharam o mesmo perfil de resistência. Contudo, este padrão de resistência foi também identificado em linhagens que apresentaram outros genótipos. Portanto, não foi possível relacionar os padrões de PFGE aos perfis de resistência identificados. De acordo com Phillips et al. (2004), a complexidade das rotas de transmissão de salmonelas de animais de produção para os consumidores favorece mudanças no padrão de ocorrência de resistência a antimicrobianos, dificultando este tipo

de associação. Além disso, algumas diferenças na suscetibilidade a antimicrobianos podem ser causadas por eventos como a aquisição de plasmídeos, os quais podem não ter sido detectados por PFGE (CARDINALE et al., 2005). Liebana et al. (2002) descrevem que a caracterização de *S. Enteritidis* somente por PFGE pode não ser suficientemente adequada para linhagens clonais. Portanto, a associação de outra metodologia para a genotipificação pode aumentar o número de perfis identificados (MASLOW et al., 1993; PANG et al., 2005).

Numa segunda etapa deste trabalho procurou-se otimizar a caracterização obtida por PFGE, buscando outra metodologia molecular que pudesse complementar a análise das linhagens. Optou-se por uma dentre as diversas metodologias baseadas em PCR, as quais em geral apresentam um menor custo operacional e são de fácil execução, além de que podem apresentar índice satisfatório de discriminação. Trabalhos anteriores já haviam analisado linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Rio Grande do Sul por RAPD (dos SANTOS, 2001) e por rep-PCR (de OLIVEIRA, 2003; BESSA, 2005), entretanto os genótipos obtidos agruparam as linhagens de forma muito próxima. Portanto, não foram consideradas metodologias adequadas para uso isoladamente na caracterização do patógeno em programas de vigilância epidemiológica.

Como alternativa, no presente estudo foi padronizado um protocolo de SE-AFLP para o emprego em *S. Enteritidis*. Para testar a capacidade de discriminação de linhagens de *S. Enteritidis* cuja prévia caracterização por PFGE no estudo anterior já havia sugerido uma relação clonal, neste segundo estudo foram incluídas na análise as linhagens de *S. Enteritidis* que não eram relacionadas a aves e a surtos.

A metodologia de SE-AFLP havia sido previamente utilizada para a análise de *S. Enteritidis*, embora somente quatro linhagens tenham sido testadas (PETERS & THRELFALL, 2001). No presente estudo, um maior número de linhagens epidemiologicamente relacionadas foi analisado, incluindo amostras não relacionadas, com origens distintas. SE-AFLP demonstrou ser uma metodologia de simples execução e os resultados foram reprodutíveis com as amostras analisadas. Entretanto, pouca diversidade foi encontrada nas amostras de origem aviária e de surtos, cuja maioria compartilhou um perfil predominante (H-G1/H-T1/H-C1). Genótipos alternativos foram identificados em

uma amostra de origem avícola, na amostra de origem suína e em duas amostras isoladas em outros países.

Todas as linhagens isoladas de alimentos e de pacientes envolvidos em surtos de salmonelose apresentaram o perfil predominante de SE-AFLP. Por outro lado, no estudo anterior, PFGE foi capaz de identificar genótipos alternativos em amostras de surtos que também foram analisadas por SE-AFLP, demonstrando que pequenas diferenças entre as linhagens de *S. Enteritidis* podem ser evidenciadas pelo uso de uma metodologia com alto poder de discriminação.

Ainda que somente uma amostra de origem suína tenha sido analisada por SE-AFLP, foi encontrado um genótipo alternativo (H-G3/H-T3/H-C3). Perfis de rep-PCR alternativos aos obtidos em amostras de origem avícola já haviam sido identificados em *S. Enteritidis* isoladas de suínos (de OLIVEIRA et al., 2005b). Isso provavelmente indica que diferentes linhagens de *S. Enteritidis* podem estar circulando entre suínos. O predomínio de um genótipo de SE-AFLP nas amostras isoladas de aves e de produtos relacionados também reflete a transmissão vertical de *S. Enteritidis* na indústria avícola.

Embora SE-AFLP tenha diferenciado *S. Enteritidis* dos demais sorovares de *S. enterica* analisados, estudos complementares sobre sua capacidade de discriminação são necessários antes de recomendar a sua utilização em estudos epidemiológicos do patógeno. Contudo, algumas estratégias podem aumentar a capacidade de discriminação da técnica. Na análise por SE-AFLP de outros gêneros de bactérias não clonais, o uso de um único *primer* parece produzir caracterização suficiente (MORENO et al., 2003; GIBSON et al., 1998). Neste trabalho, foi utilizada uma combinação dos diferentes *primers* para SE-AFLP, o que aumentou a capacidade de discriminação da técnica ao demonstrar que uma amostra pode apresentar o perfil predominante com um *primer*, e um perfil alternativo com outro *primer*. Outra possibilidade pode ser a utilização dos quatro diferentes *primers* em uma mesma reação de PCR, o que aumentou a capacidade de discriminação de SE-AFLP na tipificação de *S. Enteritidis* e de *S. Typhimurium* (MAMMINA et al., 2006).

De modo semelhante, enzimas de restrição alternativas a *HindIII* reconhecem diferentes sítios e podem produzir genótipos alternativos (VALSANGIACOMO et al., 1995; BOUMEDINE & RODOLAKIS, 1998; van der ZEE et al., 2003; TORPDAHL & AHRENS, 2004). Deve ser considerado que a obtenção de um maior número de produtos

de DNA é capaz de aumentar a capacidade de discriminação, porém torna a análise mais difícil e dependente de programas específicos para a avaliação. Por outro lado, um número reduzido de produtos de amplificação facilita a análise dos polimorfismos, embora possa equivocadamente sugerir linhagens clonais (TORPDAHL & AHRENS, 2004).

Embora o número de perfis identificados por SE-AFLP tenha sido inferior ao encontrado por PFGE no estudo anterior, este resultado confirma que há um genótipo predominante de *S. Enteritidis* circulando no Brasil e possivelmente em outros países. Ambos os resultados com PFGE e SE-AFLP parecem confirmar o caráter clonal do patógeno, previamente sugerido em outros estudos (STANLEY et al., 1991; HU et al., 2006).

Para verificar a capacidade de discriminação de SE-AFLP e esclarecer a sua utilidade na caracterização de *S. Enteritidis*, um terceiro estudo teve como objetivo comparar a metodologia a outras técnicas clássicas de tipificação do patógeno, determinando a capacidade de discriminação. Neste trabalho, não foram analisadas linhagens de origem avícola, contudo foi analisado um número maior de amostras isoladas de origem suína e de produtos cárneos derivados, também isoladas no Rio Grande do Sul. Os resultados da tipificação por SE-AFLP foram comparados à caracterização previamente obtida por outras metodologias (de OLIVEIRA, 2003).

Conforme o valor D (índice de diversidade de Simpson) (HUNTER & GASTON, 1988), SE-AFLP apresentou capacidade de discriminação ($D=0,28$) que, embora considerada baixa para tornar um método genotípico apropriado para estudos epidemiológicos de *S. Enteritidis*, foi superior às demais técnicas genotípicas comparadas. Neste mesmo trabalho, a fagotipificação e o perfil de resistência a antimicrobianos apresentaram valor D superior ao encontrado em SE-AFLP. Estes dados corroboram estudos prévios, que indicam a associação de métodos fenotípicos e genotípicos para a caracterização de *S. Enteritidis* (CHASLUS-DANCLA & MILLEMANN, 1999; LIEBANA et al., 2001; OLSEN et al., 2003).

Por outro lado, SE-AFLP foi capaz de identificar diferenças em algumas linhagens pertencentes ao mesmo fagotipo. Embora outras linhagens que compartilharam o fagotipo tenham também compartilhado o mesmo genótipo, fica evidenciado que SE-AFLP pode auxiliar na subtipificação de linhagens de *S. Enteritidis* pertencentes ao mesmo fagotipo.

Em relação ao estudo anterior, neste trabalho foi analisado um maior número de linhagens de *S. Enteritidis* de origem suína, evidenciando que embora genótipos alternativos estejam presentes, há predomínio de um genótipo, de modo semelhante ao verificado anteriormente nas amostras de origem avícola. No entanto, a capacidade de discriminação demonstrada por SE-AFLP fortemente reprovam seu uso isoladamente para a caracterização de *S. Enteritidis*, sugerindo a associação a outros métodos de tipificação fenotípicos ou moleculares.

Complementando os resultados destes estudos, um último trabalho foi proposto com o objetivo de reunir e discutir a diversidade encontrada nas linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de aves e produtos relacionados e de alimentos e humanos envolvidos em surtos através da caracterização pelos perfis de resistência a antimicrobianos, SE-AFLP, PFGE e fagotipificação. Os resultados parciais apresentados descrevem a caracterização por SE-AFLP, PFGE e pela resistência a antimicrobianos.

Foram identificados 13 diferentes perfis de resistência a antimicrobianos. Em relação ao primeiro estudo, dois novos perfis de resistência foram identificados: na amostra de origem suína e numa amostra isolada na Tanzânia. Com relação aos perfis de PFGE, Além dos genótipos descritos no primeiro estudo, neste trabalho foram identificados três perfis adicionais, um em uma das amostras isolada na Tanzânia, outro nas amostras isoladas na Itália, e um terceiro na amostra de origem suína. No total, foram encontrados 12 diferentes genótipos de PFGE. Nestas mesmas linhagens, três diferentes genótipos foram identificados com cada *primer* de SE-AFLP. Embora os genótipos identificados por ambas as técnicas sejam proximamente relacionados, houve uma maior capacidade de discriminação de PFGE em relação a SE-AFLP. Além disso, PFGE foi ainda capaz de identificar um genótipo alternativo na amostra ATCC 13076 analisada.

Foi demonstrado que os perfis de resistência a antimicrobianos em amostras de origem animal apresentaram maior variabilidade daqueles identificados em surtos. De fato, a resistência encontrada nas amostras de origem animal foi significativamente superior à encontrada em linhagens isoladas de pacientes. Isso pode refletir uma maior pressão seletiva na produção animal. Diferenças de manejo nas indústrias avícola e suinícola podem evidenciar as diferenças encontradas em relação à sensibilidade aos antimicrobianos.

A análise genotípica demonstrou que as linhagens de *S. Enteritidis* analisadas apresentam relação muito próxima, sugerindo que podem ser derivadas de um mesmo clone. No entanto, devido a diferentes condições de pressão seletiva, estas linhagens podem apresentar diferenças na sensibilidade a antimicrobianos, podendo então ser subtipificadas através do perfil de resistência a antimicrobianos. Esta variabilidade pode não ter sido identificada pelos métodos genotípicos utilizados, pois podem estar ligadas a variações na pressão seletiva ou aquisição de plasmídeos (ARBEIT, 2001; CARDINALE et al., 2005).

O caráter clonal vem sendo relatado em diversos sorovares de *S. enterica*, como *S. Enteritidis* (BÄUMLER et al., 2000; LIEBANA et al., 2004), *S. Infantis* (FONSECA et al., 2006), assim como *S. Typhimurium* (HU et al., 2006). Sugere-se que somente técnicas muito acuradas possam ser capazes de identificar pequenas diferenças nestas linhagens, tornando capazes de utilização em programas de vigilância epidemiológica. A ribotipificação vem apresentando resultados superiores a PFGE (LIEBANA et al., 2004), contudo na análise de *S. Enteritidis* de origem hospitalar isoladas no Brasil, esta metodologia tenha somente identificado dois genótipos, sugerindo que as linhagens circulantes entre os pacientes são realmente clonais (MARTINS et al., 2006). Num estudo envolvendo linhagens de origem animal e humana, isoladas num período mais amplo, foram identificados 14 diferentes perfis de ribotipificação, o que indica haver diferentes linhagens circulando pelo Brasil nos anos analisados (FERNANDES et al., 2003).

Finalmente, os resultados deste trabalho indicam que *S. Enteritidis* de origem animal e de alimentos e pacientes envolvidos em surtos de salmonelose no Rio Grande do Sul apresentam relação próxima, provavelmente derivando de uma linha clonal. Os resultados fortemente sugerem que a associação de métodos de caracterização fenotípicos e genotípicos para a discriminação necessárias a programas de investigação da origem do patógeno.

5. CONCLUSÕES

1. As linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de aves foram significativamente mais resistentes do que as linhagens isoladas de pacientes envolvidos em salmonelose.

2. Com exceção da associação sulfonamida e trimetoprima, não foram encontradas linhagens isoladas de aves e produtos relacionados, alimentos e humanos resistentes às principais classes de antimicrobianos de importância médica.

3. A ocorrência de linhagens isoladas de aves e produtos relacionados resistentes a ácido nalidíxico sugere que seu uso na avicultura deve seguir critérios prudentes, visando evitar a possibilidade de emergência de linhagens com sensibilidade reduzida a flouroquinolonas.

4. Não foi possível correlacionar os padrões de PFGE com os perfis de resistência a antimicrobianos, contudo, entre os diferentes genótipos identificados, um foi predominante, estando presente em linhagens isoladas de produtos relacionados a aves, alimentos e humanos.

5. SE-AFLP foi capaz de diferenciar *S. Enteritidis* dos demais sorovares de *S. enterica*, no entanto, a maioria das amostras isoladas no Brasil compartilhou o mesmo genótipo, não sendo portanto, diferenciadas.

6. A capacidade de discriminação de SE-AFLP foi superior quando comparada a outras técnicas baseadas em PCR, entretanto foi inferior à encontrada pela fagotipificação e pelo perfil de resistência a antimicrobianos.

7. As linhagens de *S. Enteritidis* analisadas têm relação muito próxima, havendo um genótipo predominante em cada grupo analisado, indicando que podem ser originadas de uma linha clonal.

8. A associação da tipificação por PFGE, SE-AFLP, fagotipificação e perfil de resistência a antimicrobianos é mais indicada para a caracterização das linhagens de *S. Enteritidis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; MOLBAK, K.; THRELFALL, E.J. It is time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.2, p.827-829, 2003.
- AARTS, H.J.M.; van LITH, L.A.J.T.; KEIJER, J. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, n.26, p.131-135, 1998.
- ABEF (Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos). **Relatório anual**, 2005. Disponível em: <www.abef.com.br>. Acesso em 28 dez. 2006.
- AHMED, R. et al. Epidemiological typing of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in a Canada-wide outbreak of gastroenteritis due to contaminated cheese. **Journal of Clinical Microbiology**, n.6, vol.38, p.2403-2406, 2000.
- ANGULO, F.J. et al. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. **Microbial Drug Resistance**, v.6, n. 1, p. 77-83, 2000.
- ANGULO, F.J.; NARGUND, V.N., CHILLER, T.C. Evidence of an association between use of antimicrobial agents in food animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and the human consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.51, p. 374-379, 2004.
- ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: ARBEIT, R.D. **Manual of Clinical Microbiology**. 7.ed., 2001. p.116-137.
- BAKERI, S.A. et al. Genetic diversity of human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Malaysia. **Journal of Applied Microbiology**, n.95, p.773-780, 2003.
- BAÚ, A.J.; CARVALHAL, J.B., ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n.2, p.303-307, 2001.
- BÄUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, n.287, p.50-52, 2000.
- BERCHIERI JUNIOR, A. et al. *Salmonella* em um abatedouro avícola. **Ars Veterinária**, v.3, n.1, p.81-87, 1987.
- BERCHIERI JUNIOR, A. et al. Farinha de carne como fonte de *Salmonella* em granja avícola. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.9, n.1/2, p.9-12, 1989.

- BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.** 2006. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- BETANCOR, L. et al. 2004. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.3; p.1155-1162, 2004.
- BLAHA, T.E. Pre-harvest food safety and *Salmonella* reduction in the pork chain. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Resumos.** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p. 39-47.
- BOUMEDINE, K.S.; RODOLAKIS, A. AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies. **Research in Microbiology**, v.149, p.735-744, 1998.
- BRENNER, F.W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.
- BUSANI, L, et al. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Enteritidis and Infantis from human infections, foodstuffs and farm animals in Italy. **Epidemiology and Infection**, v.132, p.245-51, 2004.
- CAPRIOLI, A. et al. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiology and microbiological methodologies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.295-301, 2000.
- CARDINALE, E. et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from humans and broiler chickens in Senegal using pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibility. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.968-977, 2005.
- CARRAMIÑANA, J.J. et al. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v.104, p.133-9, 2004.
- CHAMPION, O.L.; BEST, E.L.; FROST, J.A. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism techniques for investigating outbreaks of enteritis due to *Campylobacters*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.6, p.2263-2265, 2002.
- CHASLUS-DANCLA, E.; MILLEMANN, Y. Rational approach to the choice of molecular markers applicable to the tracing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED,

A.M. (Ed.). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis and control. Iowa: University Press, 1999. p.141-151.

CORRY, J.E.L. et al. Sources of *Salmonella* on broiler carcasses during transportation and processing: modes of contamination and methods of control. **Journal of Applied Microbiology**, v.92, p.424-432, 2002.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.33, p.342-346, 2002.

COYLE, E.F. et al. *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection: association with hen's eggs. **The Lancet**, v.322, n.8623, p.1295-1297, 1988.

DAVIES, P.R. The impact of societal issues in pork production on domestic and international market access. In: SIMPÓSIO UFRGS SOBRE MANEJO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 1., 2006, Porto Alegre. **Resumos**. Porto Alegre: Setor de Suínos, 2006. p.1-17.

de BUCK, J. et al. Colonization of the chicken reproductive and egg contamination by *Salmonella*. **Journal of Applied Microbiology**, n.97, p.233-245, 2004.

de OLIVEIRA, S.D. **Detecção de *Salmonella* sp. e caracterização de isolados de *Salmonella* Enteritidis pela presença de genes de virulência, resistência a antimicrobianos e por rep-PCR fingerprinting**. 2003. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.

de OLIVEIRA, S.D., et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v.97, p.297-305, 2005.

de OLIVEIRA, S.D., et al. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates by rep-PCR fingerprinting. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23., 2005, Santos. **Resumos**. Santos: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2005b. Disponível em CD-ROM.

DESAI, M.; THRELFALL, E.J.; STANLEY, J. Fluorescent amplified length polymorphism subtyping of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 clone complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.1, p.201-206, 2001.

dos SANTOS, L.R. **Fagotipagem e análise por RAPD/PCR (DNA polimórfico amplificado ao acaso) de amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de materiais de origem avícola e de alimentos e humanos envolvidos em casos de toxinfecções alimentares**. 2001. 178 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

dos SANTOS, L.R. et al. Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45, p.1-4, 2003.

DOYLE, M.P., CLIVER, D.O. *Salmonella*. In: CLIVER, D.O. (Ed.). **Foodborne diseases**. San Diego: Academic Press, 1990. p.185-204.

DUIM, B. et al. High-resolution of *Campylobacter* strains isolated from poultry and humans with amplified fragment length polymorphism fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, p.2369-2375, 1999.

EDWARDS, R.A.; OLSEN, G.J.; MALOY, S.R. Comparative genomics of closely related *Salmonellae*. **Trends in Microbiology**, v.10, n.2, p.94-99, 2002.

ENDTZ, H.P. et al. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.27, p.199-208, 1991.

FAKHR, M.K.; NOLAN, L.K.; LOGUE, C.M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.5, p.2215-2219, 2005.

FERNANDES, S.A. et al. Phenotypic and molecular characterization of salmonella Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n.45, v.2, p.59-63, 2003.

FERNANDEZ, J. et al. Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1617-1622, 2003.

FISHER, I.S.T. Dramatic shift in the epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in Western Europe, 1998-2003- results from the Enter-net international *Salmonella* database. **Euro Surveillance**, v.9, n.10-12, p.43-45, 2004.

FONSECA, E.L. et al. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.8, p.2767-2772, 2006.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança alimentar**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 1 v.

GAMA, N.M.S.Q.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S.A. Occurrence of *Salmonella* sp in laying hens. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p.15-21, 2003.

GAST, R.K.; BEARD, C.W. Research to understand and control *Salmonella enteritidis* in chickens and eggs. **Poultry Science**, v.72, p.1157-1163, 1993.

- GEIMBA, M.P. et al. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v.67, n.6, p.1229-1233. 2004.
- GIBSON, J.R. et al. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprinting and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.9, p.2580-2585, 1998.
- GILLESPIE, I.A. et al. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks? **Epidemiology and Infection**, v.133, n.5, p.795-801, 2005.
- GEBREYES, W.A.; ALTIER, C.; THAKUR, S. Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. **Epidemiology and Infection**, v.134, p.187-198, 2006.
- GUARD-PETER, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, n.3, v.7, p.421-430, 2001.
- HELMUTH, R.; SCHROETER, A. Molecular typing for *S. Enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, n.21, p.69-77, 1994.
- HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiology and Infection**, v.129, p.1-8, 2002.
- HEYNDRICKX, M. et al. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. **Epidemiology and Infection**, v.129, p.253-265, 2002.
- HOLTBY, I. et al. Two separate outbreak of *Salmonella enteritidis* phage type 14b food poisoning linked to the consumption of the same type of frozen food. **Public Health**, v.120, p.817-823, 2006.
- HU, H.; LAN, R.; REEVES, P.R. Adaption of multilocus sequencing for studying variation within a major clone: evolutionary relationships of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Genetics**, v.172, p.743-750, 2006.
- HUDSON, C.R. et al. Determination of close genetic relatedness of the major *Salmonella* Enteritidis phage types by pulsed-field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several *Salmonella* virulence genes. **Avian Diseases**, n.45, p.875-886, 2001.
- HUMPHREY, T.J. Contamination of eggs and poultry meat with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M. (Ed.). ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis and control**. Iowa: University Press, 1999. p.183-192.

- HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, n.26, p.2465-2466, 1988.
- IRINO, K. et al. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, p.193-196, 1996.
- KAKU, M.. et al. Outbreak of *Salmonella* Enteritidis in northwest of S. Paulo State, Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v.29, p.127-131, 1995.
- KANASHIRO, A.M.I. et al. Serovars of *Salmonella* spp. isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.7, p.195-198, 2005.
- KINGSLEY, R.A.; BÄUMLER, A.J. Host adaption and the emergence of infectious disease: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiology**, v.36, n.5, p.1006-1014, 2000.
- KIMURA, A.K. et al. Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: a case-control study in FoodNet sites. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.244-252, 2004.
- LANGVAD, B. et al. Transmission routes of *Salmonella* Typhimurium DT 104 between 14 cattle and pig herds in Denmark demonstrated by molecular fingerprinting. **Journal of Applied Microbiology**, v.101, p.883-890, 2006.
- LIEBANA, E. et al. Diversity of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, n.1, p.154-161, 2001.
- LIEBANA, E. et al. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 4, 7, 6, 8, 13a, 29 and 34: a comparative analysis of the genomic fingerprints from geographically distant isolates. **Journal of Applied Microbiology**, n.92, p.196-209, 2002.
- LIEBANA, E. et al. Use of molecular fingerprinting to assist the understanding of the epidemiology of *Salmonella* contamination with broiler production. **British Poultry Science**, n.43, p.38-46, 2002b.
- LIEBANA, E. et al. Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. **Journal of Applied Microbiology**, n.94, p.1024-1029, 2003.
- LIEBANA, E. et al. Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.189-195, 2004.

LINDSTEDT, B. et al. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.4, p.1623-1627, 2000.

MALORNY, B.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.43, p.2278-82, 1999.

MAMMINA, C. et al. Single-enzyme- amplified polymorphism (SE-AFLP) in *Salmonella* epidemiology. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SALMONELLA AND SALMONELLOSIS, 2006, Saint-Malo, France. **Proceedings**. Saint-Malo: ISPAIA, 2006. p.121-123.

MANFREDA, G.; de CESARE, A. *Campylobacter* and *Salmonella* in poultry and poultry products: how and whys of molecular typing. **World's Poultry Science Journal**, v.61, p.185-197, 2005.

MARTINS, C.H.G. et al. Ripotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, n.1, p.19-23, 2006.

MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E., ARBEIT, R.D. Molecular epidemiology: applications of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clinical Infectious Diseases**, n.17, p.153-164, 1993.

McLAUHLIN, J. et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, p.21-28, 2000.

MENDOZA, M.C.; LANDERAS, E. Molecular epidemiological methods for differentiation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis strains. In: SAEED, A.M. ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animal: epidemiology, pathogenesis and control**. Iowa: University Press, 1999. p. 125-140.

MIKASOVÁ, E. et al. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains of veterinary origin by molecular typing methods. **Veterinary Microbiology**, v.109, p.113-120, 2005.

MOLBAK, K. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans- the public health consequences. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.51, p. 364-369, 2004.

MOLBAK, K.; GERNER-SMIDT, P.; WEGENER, H.C. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.5, p.514-15, 2002.

- MORENO, A.M. et al. Use of single-enzyme amplified fragment length polymorphism for typing *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* isolates from pigs. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.4, p.1743-1746, 2003.
- NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHIMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.47-51, 2004.
- O'BRIEN, S.J.; de VALK, H. *Salmonella*- "old" organism, continued challenges. **Eurosurveillance**, n.2, v.8, p.29-31, 2003.
- OLIVE, M.D.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, n.6, v.37, p.1661-1669, 1999.
- OLSEN, S.J. et al. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. **Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.753-764, 2001.
- OLSEN, J.E. et al. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, p.826-835, 2003.
- PANG, J.C. et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.1472-1483, 2005.
- PATRICK, M.E. et al. *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1995-1999. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, n.1, p.1- 7, 2004.
- PERESI, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, n.32, v.5, p.477-483, 1998.
- PETERS, T.M. et al. The Salm-gene project: a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. **Eurosurveillance**, n.2, v.8, p.46-50, 2003.
- PETERS, T.M.; THRELFALL, E.J. Single-enzyme amplified fragment length polymorphism and its applicability for *Salmonella* epidemiology. **Systematic and Applied Microbiology**, v.24, p.400-404, 2001.
- PHILLIPS, I. et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 28-52, 2004.
- POPPE, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M. ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animal: epidemiology, pathogenesis and control**. Iowa: University Press, 1999. p. 3-18.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2001 (no. 45) to Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, n.154, p.173-174, 2003.

POWELL, N.G. et al. Subdivision of *Salmonella enteritidis* PT4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. **FEMS Microbiology Letters**, n.119, p.193-198, 1994.

RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, A.J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, n.3, p.237-247, 2001.

RASSCHAERT, G. et al. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.8, p.3615-3623, 2005.

RICKE, S.C. The gastrointestinal tract ecology of *Salmonella* Enteritidis colonization in molting hens. **Poultry Science**, n.82, p.1003-1007, 2003.

ROCOURT, J. et al. The present state of foodborne disease in OECD countries. World Health Organization, p.1-43, 2003. Disponível em: <www.who.int/em/>. Acesso em: 31 dez. 2006.

RODRIGUE, D.C.; TAUXE, R.V.; ROWE, B. International increase in *Salmonella enteritidis*: a new pandemic? **Epidemiology and Infection**, v.105, p.21-27, 1990.

SANDT, C.H. et al. The key role of pulsed-field gel electrophoresis in investigation of a large multiserotype and multistate food-borne outbreak of *Salmonella* infections centered in Pennsylvania. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.9, p.3208-3212, 2006.

SAVELKOUL, P.H.M. et al. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.10, p.3083-3091, 1999.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; WALSH, T.R. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p.431-437, 2001.

SCOTT, F. et al. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella* Enteritidis: a method suitable for rapid outbreak recognition. **Clinical Microbiology and Infection**, v.7, n.9, p.479-485, 2001.

SHELOBOLINA, E.S. et al. 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**, v.70, n.5, p.2959-2965. 2004.

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

SOLARI, C.A. et al. Caracterização dos sorovares de *Salmonella* isolados de aves de diferentes Estados no quinquênio 1992-96. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 19., 1997, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p.126.

SOOD, S. et al. Combination of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP) for differentiation of multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, n.8, p.154-161, 2002.

STANLEY, J.; JONES, C.S.; THRELFALL, E.J. Evolutionary lines among *Salmonella enteritidis* phage types are identified by insertion sequence IS200 distribution. **FEMS Microbiology Letters**, n.82, p. 83-90, 1991.

SWAMINATHAN, B. et al. Pulsenet, the national molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.3, p.382-389, 2001.

TAVECHIO, A.T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, n.5, p.315-322, 1996.

THRELFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.141-148, 2002.

THRELFALL, E.J. et al. Assessment of factors contributing to changes in the incidence of antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium from humans in England and Wales in 2000, 2002 and 2004. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.28, n.5, p.389-395, 2006.

THRELFALL, E.J.; CHART, H. Interrelationships between strains of *Salmonella* Enteritidis. **Epidemiology and Infection**, n.111, p.1-8, 1993.

TSEN, H.Y.; LIN, J.S.; HSIH, H.Y. Pulsed-field electrophoresis for animal *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* isolates in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, v.87, p.73-80, 2002.

TORPDAHL, M.; AHRENS, P. Population structure of *Salmonella* investigated by amplified fragment length polymorphism. **Journal of Applied Microbiology**, v.97, p.566-573, 2004.

TORPDAHL, M. et al. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p.173-184, 2005.

UBA (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA). Relatório anual 2005/2006. Disponível em: <www.uba.org.br>. Acesso em 28 dez. 2006.

VALSANGIACOMO, C. et al. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.1716-1719, 1995.

van der ZEE, A. et al. Use of multienzyme multiplex PCR amplified fragment length polymorphism typing in analysis of outbreaks of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.2, p.798-802, 2003.

VELLAPPAN, N. et al. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.39, p.77-83, 2001.

VOETSCH, A.C. et al. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.127-134, 2004.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acid Research**, v.23, n.21, p.4407-4414, 1995.

WEIGEL, R.M. et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. **Veterinary Microbiology**, v.100, p.205-217, 2004.

WOO, Y. Finding the sources of Korean *Salmonella enterica* serovar Enteritidis PT4 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. **The Journal of Microbiology**, v.43, n.5, p.424-429, 2005.

ZAID, M.B., et al. Nontyphoidal *Salmonella* from human clinical cases, asymptomatic children, and raw retail meats in Yucatan, Mexico. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.21-28, 2006.

ANEXOS