

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos,
PCR-ribotipificação e RAPD de *Salmonella* Enteritidis envolvidas
em surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos ocorridas no Rio
Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002

Fernanda Arboite de Oliveira

PORTO ALEGRE
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Caracterização por susceptibilidade a antimicrobianos,
PCR-Ribotipificação e RAPD de *Salmonella* Enteritidis envolvidas
em surtos de Doenças Veiculadas por Alimentos ocorridas no Rio
Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002

Fernanda Arboite de Oliveira
Engenheira de Alimentos

Dissertação apresentada como
requisito para a obtenção do grau
de Mestre em Microbiologia
Agrícola e do Ambiente, na área de
Microbiologia de Alimentos
Orientador: Adriano Brandelli
Co-orientador: Eduardo Cesar
Tondo

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
Fevereiro 2005

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adriano Brandelli, meu orientador, pela confiança e pelo exemplo desde o início da minha vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo, pela orientação, pela inspiração, por ter me ensinado como se faz pesquisa e por ter me dado a honra de aprender com seu exemplo e de poder contar com seus conselhos.

À “família ICTA”, em especial à prof^a Erna e ao prof. Caciano por serem estímulos para minhas escolhas profissionais.

À Ana Paula Guedes Frazzon, pelo auxílio imprescindível na realização das análises por RAPD e pelo exemplo de bom humor, perseverança e amizade.

À Eng^a de Alimentos Kátia Suzana Heckler, pela amizade e colaboração com os antibiogramas.

Às colegas Florência Cladera e Roberta Thys pelo exemplo de sucesso e realização profissional.

À amiga/irmã Fabiana Thomé da Cruz, pelo brilho nos olhos nas discussões sobre a ciência e sobre a vida.

À Letícia Sopeña, por ter sido amiga, além de colega de mestrado e por ter me ensinado o valor dos detalhes e das pequenas coisas do dia-à-dia no Laboratório.

À Taís Pereira Munari, amiga desde sempre, pelo estímulo e por ter me socorrido do estresse no final desse trabalho.

Ao grande amigo Fábio Perini Milara, pelo companheirismo e otimismo.

Ao Luly, por sua generosidade e amizade, por ter salvado essa dissertação da “vala comum do Windows XP” (por duas vezes).

Ao nego Léó, por seu amor e colaboração mesmo à distância.

À Dani, ao Cléber e à Gabi, meus manos, pelo amor, cada um a sua maneira. Em especial ao meu irmão Guilherme, que apesar da pouca idade, soube valorizar e enriquecer esse trabalho nas nossas conversas sobre “as bactérias” e no olhar de admiração que me dirigia enquanto eu estudava.

Aos meus queridos pais, João e Erica, que sempre respeitaram e apoiaram as minhas escolhas e vibraram com as minhas conquistas.

A Deus pela capacidade de aprender e à vó Mercedes por ter puxado comigo mais essa meada.

A todos que de alguma forma colaboraram com a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A *Salmonella* é uma das principais causas de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, sendo que no Rio Grande do Sul ela tem sido apontada como o principal agente de toxinfecções alimentares nos últimos anos. Nesse trabalho, foram caracterizadas linhagens de *Salmonella* isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul, no período de 2001 a 2002. Entre os 85 isolados investigados, 79 (93%) foram sorotipificados como *S. Enteritidis*, enquanto os outros seis isolados foram classificados como *S. Javiana* (n=1), *S. Infantis* (n=1), *S. Agona* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1) e *S. enterica* subsp. *enterica* (1,4,5) (n=2). A resistência das amostras de *S. Enteritidis* a dez agentes antimicrobianos foi investigada. De modo geral, altas porcentagens de sensibilidade foram verificadas. As maiores porcentagens de resistência foram apresentadas em relação ao ácido nalidíxico (21,5%), à gentamicina (12,7%) e à estreptomicina (11,4%). A resistência a um ou mais antimicrobianos foi verificada em 30 amostras (37,97%), o que permitiu que os isolados fossem agrupados em 32 perfis de susceptibilidade. Apenas duas amostras apresentaram resistência múltipla a quatro drogas. Quando os isolados de *S. Enteritidis* foram submetidos à PCR-Ribotipificação, somente dois perfis (R1 e R2) foram identificados, sendo que o perfil R1 agrupou 92,4% dos isolados. Os mesmos isolados também foram analisados por RAPD, sendo possível identificar quatro perfis de bandas (A a D). O perfil A agrupou 81% das amostras, enquanto os perfis B, C e D agruparam 9%, 5% e 5% dos isolados, respectivamente. Os resultados das análises de PCR-Ribotipificação e de RAPD sugerem que uma mesma linhagem de *S. Enteritidis* foi isolada a partir de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas em diferentes cidades do Estado durante o período de 2001 a 2002.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (85p.) Fevereiro, 2005.

ABSTRACT

Salmonella has been recognized as one of the major causes of foodborne diseases worldwide, being that in Rio Grande do Sul, south of Brazil, it is recognized as the main cause of gastroenteritis occurred in the last years. We characterized *Salmonella* strains isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, during 2001 to 2002. Among the 85 isolates investigated, 93% (n=79) were serotyped as *S. Enteritidis*, while six isolates were classified as *S. Javiana* (n=1), *S. Infantis* (n=1), *S. Agona* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1), and *S. enterica subsp. enterica* (1,4,5) (n=2). Antimicrobial resistance of the isolates of *S. Enteritidis* was determined. The isolates were individually tested against 10 antimicrobial agents. Susceptibility testing revealed that high percentages of susceptibility were often found to all drugs. The predominant resistance pattern observed was to nalidixic acid (21.5%), gentamicin (12.7%), and streptomycin (11.4%). Resistance was verified in 30 isolates (37.97%), and it was possible to identify 31 resistance patterns. Two isolates demonstrated resistance to four drugs. When *S. Enteritidis* isolates were submitted to PCR-ribotyping, only two profiles (R1 and R2) were identified, being that profile R1 grouped 92,4% of the isolates. RAPD analysis confirmed these results, once four profiles (A to D) were found. Profile A grouped 81% of the isolates, while profile B, C, and D grouped 9%, 5%, and 5% of the isolates, respectively. The majority of the isolates presented identical PCR-ribotyping and RAPD patterns, suggesting that the same strain of *S. Enteritidis* were isolated from foods involved in Salmonellosis occurred in different cities of the South of Brazil during 2001 to 2002.

¹Master of Science dissertation in Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (85p.) Febrero, 2005.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo Geral.....	3
1.2 Objetivos Específicos.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Características gerais do microrganismo.....	4
2.2 Características bioquímicas.....	5
2.3 Características sorológicas.....	5
2.4 Características das Salmoneloses.....	7
2.5 Patogenicidade.....	9
2.6 Veículos de contaminação no cenário atual.....	11
2.7 O sorovar <i>S. Enteritidis</i>	15
2.8 Resistência a antimicrobianos.....	16
2.9 Prevenção e controle da contaminação de alimentos.....	18
2.10 Tipificação molecular.....	20
2.10.1 PCR-ribotipificação.....	22
2.10.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Amostras de <i>Salmonella</i> spp., identificação e sorotipificação.....	26
3.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	26
3.3 Caracterização molecular	27
3.3.1 <i>Extração de DNA</i>	28
3.3.1.1 Lise enzimática.....	28
3.3.1.2 Lise por tratamento térmico.....	29
3.3.2 <i>PCR-Ribotipificação</i>	30
3.3.2.1 <i>Seleção das seqüências iniciadoras</i>	30
3.3.2.2 <i>Reação de PCR</i>	30
3.3.3 RAPD.....	31
3.3.3.1 <i>Seleção das seqüências iniciadoras</i>	31
3.3.3.2 <i>Reação de PCR</i>	31
3.3.4 Critérios para interpretação dos resultados das análises por PCR-Ribotipificação e RAPD.....	32
3.4 Análise Estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Sorotipificação.....	34
4.2 Susceptibilidade a antimicrobianos.....	34

4.3 PCR-ribotipificação.....	40
4.4 RAPD.....	41
4.5 Reprodutibilidade dos métodos moleculares.....	42
5. DISCUSSÃO.....	43
5.1 Sorotipificação.....	43
5.2 Susceptibilidade a antimicrobianos.....	46
5.3 Caracterização Molecular por PCR-ribotipificação e RAPD.....	52
6. CONCLUSÕES.....	58
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
APÊNDICE A – Características das amostras de <i>Salmonella</i> sp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Rio Grande do Sul, no período de 2001 a 2002.....	74
APÊNDICE B –Análise Estatística.....	83

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** -Porcentagens gerais de resistência a antimicrobianos das amostras de *S. Enteritidis* (n=79) isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002.....35
- TABELA 2** - Porcentagens de resistência a antimicrobianos das amostras de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul, por ano (2001 e 2002).....36
- TABELA 3** - Perfis de resistência a antimicrobianos das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no RS, nos anos de 2001 e 2002.....37

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Perfis de PCR-ribotipificação das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Rio Grande do Sul durante os anos de 2001 e 2002.....40
- FIGURA 2** – Perfis de RAPD das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos de Salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul durante os anos de 2001 e 2002. Os fragmentos de DNA foram gerados usando o iniciador P1254.....41

LISTA DE ABREVIATURAS

RS: Rio Grande do Sul

DVS: Divisão de Vigilância Sanitária

SES: Secretária Estadual de Saúde

PCR: Polymerase Chain Reaction

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA

ICMSF: International Commission Microbiological Specification for

Foods

LPS: lipopolissacarídeo

SPI : *Salmonella* Pathogenicity Island

spv: *Salmonella* plasmid virulence

DTA: doença transmitida por alimentos

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Taq: *Thermus aquaticus*

LACEN/RS: Laboratório Central do Estado

FDA: Food and Drug Administration

ICTA: Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos

TSB: Tryptic Soy Broth

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

TE: Tris-EDTA

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

REP: Repetitive Extragenic Palindromic

kb: kilobase

1. INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é uma das principais causas de doenças veiculadas por alimentos em diversos países, sendo responsável por sérios problemas de saúde pública e significativas perdas econômicas. Embora mais de 2400 sorovares de *Salmonella* tenham sido identificados, nos últimos anos os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* têm sido reconhecidos como os dois maiores agentes etiológicos de Salmoneloses de origem alimentar em humanos.

No Brasil, não há dados precisos sobre a ocorrência das Salmoneloses na totalidade do território nacional, contudo no Rio Grande do Sul (RS) a Divisão de Vigilância Sanitária (DVS/SES/RS) aponta esse microrganismo como o agente etiológico responsável pelo maior número de surtos alimentares, na última década. Além disso, estima-se que apenas uma pequena porcentagem dos casos de Salmoneloses seja notificada aos órgãos de saúde pública, ressaltando, assim, a relevância do problema.

Dentro deste contexto, a tipificação das linhagens de *Salmonella* responsáveis por surtos alimentares assume um papel muito importante para o conhecimento das suas características específicas e para a identificação das reais fontes de contaminação de alimentos, possibilitando a prevenção desses surtos.

Diversos métodos têm sido empregados na caracterização fenotípica e genotípica das *Salmonella* spp., sendo que caracterizações mais precisas requerem a utilização simultânea de diferentes métodos. Atualmente, sabe-se que a maioria dos surtos é causada por linhagens específicas e diversos estudos demonstram a necessidade da utilização de técnicas moleculares com adequado poder de discriminação para a investigação destes microrganismos. Os métodos moleculares baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction*) constituem uma importante ferramenta para estudos epidemiológicos de surtos de Salmonelose, uma vez que apresentam adequado poder de discriminação, custo relativamente baixo, além de facilidade de realização das análises e de interpretação dos resultados. Entre essas técnicas, pode-se destacar a PCR-Ribotipificação e a RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), as quais têm sido bastante utilizadas na caracterização de *Salmonella*. Contudo, tais técnicas não devem ser aplicadas sem antes uma discriminação prévia das amostras através de métodos fenotípicos, como o bioquimismo e a sorotipificação, os quais são reconhecidos como a base de muitos estudos epidemiológicos. Além disso, a caracterização dos perfis de resistência a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* tem assumido um papel importante nos últimos anos, principalmente devido ao envolvimento de linhagens multi-resistentes em surtos alimentares. Em vista disso, o presente trabalho tem os seguintes objetivos:

1.1 Objetivo Geral:

Caracterizar fenotípica e genotipicamente linhagens de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de Salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul, no período de 2001 a 2002.

1.2 Objetivos específicos:

- Determinar os principais sorovares envolvidos nas Salmoneloses.
- Determinar os perfis de resistência a antimicrobianos das linhagens de *Salmonella* isoladas.
- Caracterizar os perfis de PCR-Ribotipificação e RAPD das linhagens de *Salmonella* isoladas.
- Comparar as características das linhagens de *Salmonella* estudadas nesse trabalho com aquelas isoladas nos anos de 1999 e 2000 já caracterizadas pelo nosso grupo de pesquisa.
- Determinar se ocorrem de linhagens similares de *Salmonella* em diferentes regiões do Rio Grande do Sul.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características gerais do microrganismo

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*; são bastonetes Gram negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos que não fermentam a lactose (KONEMAN et al., 1997). A maioria, com exceção das *Salmonella Pullorum* e *Salmonella Gallinarum*, é móvel através de flagelos peritríquios (ANDREWS et al., 1992).

Todos os sorovares de *Salmonella* são considerados potencialmente patogênicos, sendo o grau de virulência dependente da própria linhagem, do hospedeiro e do meio ambiente (BURR et al., 1998).

O pH ótimo para a sua multiplicação encontra-se próximo a 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são considerados bactericidas (CHUNG & GOEPFERT, 1970). Quanto à temperatura, são mesófilas, multiplicando-se, preferencialmente numa temperatura de incubação entre 35 e 37°C, porém, existem relatos de crescimento em temperaturas entre 5 e 47°C (D'AOUST, 1991).

Outro fator que afeta o crescimento da *Salmonella* é atividade de água (a_w). O crescimento é inibido em meios com a_w inferiores a 0,94, sendo que o valor ótimo para o crescimento é de 0,95 (ICMSF, 1980).

Ao contrário do *S. aureus*, a *Salmonella* sp. é incapaz de tolerar elevadas concentrações de sais, sendo que a salmoura (9%) apresenta efeito bactericida (GIBSON et al, 1988).

2.2 Características bioquímicas

Segundo Popoff & Le Minor (1997), *Salmonella* possui como principais características bioquímicas, a capacidade de redução de nitratos a nitritos, produção de gás a partir da glicose, utilização do citrato como única fonte de carbono, fermentação de dulcitol e inositol, produção de sulfeto de hidrogênio em meios como TSI, LIA e SIM e reações de descarboxilação de lisina, ornitina e arginina, usualmente positivas. Além disso, a *Salmonella* não apresenta atividade de hidrólise da uréia e não fermenta a lactose, sacarose, salicina e rafinose. Apresenta também, reações de indol e fenilalanina negativas.

2.3 Características sorológicas

A taxonomia do gênero *Salmonella* é baseada na composição de seus antígenos de superfície, os quais são antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Este esquema de classificação, proposto por Kauffman (1972), divide o gênero *Salmonella* em sorovares. Atualmente, o gênero *Salmonella* está dividido em 2 espécies (*S. enterica* e *S. bongori*) e em mais de 2.400 sorovares (POPOFF et al., 2003).

A subespécie *enterica* agrupa as salmonelas associadas às infecções (principalmente gastroenterites) em humanos e animais de sangue

quente, enquanto a *S. bongori* é encontrada em animais de sangue frio e no ambiente (BARROW, 1999).

Além da fórmula antigênica, alguns sorovares recebem denominação conforme a síndrome relacionada (Typhi, Paratyphi, etc.), o hospedeiro específico (Abortusovis, Abortusequi, Cholerasuis, entre outros) ou a origem geográfica dos primeiros isolamentos (London, Panamá, Canadá, etc.). Apesar da grande quantidade de sorovares, em termos práticos, menos de 50 são realmente prevalentes e isolados mais freqüentemente a partir de infecções em humanos e animais (KILGER & GRIMONT, 1993).

A caracterização sorológica é realizada após a classificação bioquímica da *Salmonella*. spp. Em virtude da grande variedade de sorovares identificados, essa caracterização assume papel muito importante na investigação epidemiológica de surtos de Salmonelose de origem alimentar. Atualmente, sabe-se que parcelas significativas de surtos são causados por sorovares específicos, principalmente por linhagens de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (DARWIN & MILLER, 1999; BAAY & IN'T VELT, 2000).

Segundo Doyle & Cliver (1990), a parede celular da *Salmonella* spp. contém quatro camadas: LPS, fosfolipídica, lipoprotéica e peptideoglicano. O antígeno somático O pertence à camada LPS, a qual contém endotoxinas, que penetram na corrente sanguínea, podendo produzir febre no hospedeiro. Antígenos flagelares (H) têm constituição protéica e localizam-se externamente à parede celular, sendo responsáveis pela motilidade bacteriana. Existem também os antígenos ditos F ou pili tipo 1 (fímbrias), que também são de origem protéica, encontram-se na parte externa da superfície celular, mas que,

em geral, não são importantes para a identificação por estarem presentes em todos os sorovares e serem antígenicamente similares. Estes antígenos são abundantemente produzidos quando o organismo multiplica-se aerobicamente, sendo considerados importantes fatores de adesão.

Considerando a patogênese, os sorovares de *Salmonella* podem ser divididos em dois grupos principais. Um grupo é responsável pela doença sistêmica, que infecta um número restrito de espécies hospedeiras e raramente é envolvido em gastroenterite. Exemplos desses sorovares são a *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, ambos adaptados a aves, que causam o tifo aviário e a pulorose, respectivamente. O outro grupo, composto pela maioria dos sorovares, causa a gastroenterite e somente produz doença sistêmica sob condições especiais (BARROW, 1999).

2.4 Características das Salmoneloses

As doenças causadas por *Salmonella* sp. são conhecidas como Salmoneloses e podem ser divididas em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi, as febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi (tipos A, B e C) e as enterocolites, causadas pelos demais sorovares.

A febre tifóide só acomete humanos e, normalmente, é transmitida por alimentos ou água contaminada com material fecal humano. Como o reservatório de *S. Typhi* é o homem, em alguns casos as pessoas acometidas podem tornar-se portadores assintomáticos, tornando-se a principal fonte de contaminação de alimentos e águas. A febre entérica é muito semelhante à febre tifóide, porém apresenta sintomas mais brandos, os quais podem persistir

por até três semanas, ao contrário da primeira enfermidade que pode persistir por até nove semanas (BLASER & NEWMAN, 1982).

Os sintomas da febre tifóide são causados pelo lipopolissacarídeo (LPS), que induz uma resposta inflamatória local durante a invasão da mucosa (CHALKER & BLASER, 1988). Já os sintomas das gastroenterites resultam, provavelmente, da invasão das células da mucosa. A *S. Typhi* causa uma infecção sistêmica, enquanto patógenos entéricos como a *S. Enteritidis* raramente penetram além dos tecidos submucosos (GALÁN et al., 1992).

A doença mais comumente causada por *Salmonella* sp., a enterocolite resultante também da ingestão de alimentos ou água contaminada, é uma das mais freqüentes infecções de origem alimentar em vários países (THIEL, 1999; SCHMID & BAUMGARTNER, 1999; GERNER-SMIDT & WEGENER, 1999; TSCHÄPE et al., 1999, GRIMONT et al., 1999). Apesar da enterocolite ser a mais branda das manifestações causadas por *Salmonella* spp., a alta freqüência de casos é responsável por milhares de mortes todos os anos. Somente nos Estados Unidos da América, estima-se que, a cada ano, ocorram de 800 a 4000 mortes devido à Salmonelose (FORSYTHE, 2002). Os sintomas mais comumente associados a enterocolites são as diarréias sanguinolentas, vômitos, febre, dores abdominais e a desidratação, podendo resultar em morte.

Tais enfermidades têm sido responsáveis por grandes prejuízos econômicos decorrentes do tratamento dos casos clínicos, do recolhimento de lotes de alimentos contaminados ou do impacto sobre a confiabilidade dos

consumidores frente aos produtos de marcas envolvidas nos surtos de Salmonelose (THONG et al., 1995).

2.5 Patogenicidade

Após a ingestão de alimentos ou de água contaminada, o microrganismo pode penetrar no epitélio intestinal e posteriormente localizar-se nas camadas epiteliais mais profundas. Evidências indicam que a bactéria associa-se, preferencialmente, a macrófagos no interior das placas de Peyer, no íleo distal, induzindo a formação de ondas na superfície das células infectadas, nos sítios de entrada do microrganismo. Dependendo do sorovar e do hospedeiro infectado, as *Salmonella* spp. podem ser transportadas pelos macrófagos para tecidos como fígado e baço, onde se multiplicam, ou podem permanecer na lâmina própria do epitélio intestinal (OGUNNIYI et al., 1997).

O processo de invasão da mucosa intestinal por *Salmonella* tem sido bastante estudado sob o ponto de vista genético. Atualmente, existem fortes evidências que um grande agrupamento de genes, conhecido como “*Salmonella* Pathogenicity Island 1” (SPI 1), foi adquirido de outras espécies de bactérias patogênicas durante o processo evolutivo. A região do genoma da SPI 1, de aproximadamente 40kb, é responsável pela síntese de mais de 30 proteínas que formam uma estrutura molecular complexa necessária para a invasão da célula hospedeira (DARWIN & MILLER, 1999). Os genes dessa região podem ser divididos em dois grupamentos (*inv-spa* e *prg-org*), conforme a organização dentro do cromossomo bacteriano. O agrupamento *inv-spa* já foi

completamente seqüenciado e apresenta genes de 11 proteínas estruturais (*invA*, *invB*, *invC*, *invE*, *invG*, *invH*, *invI*, *spaP*, *spaQ*, *spaR*, *spaS*) e três reguladoras, todos altamente conservados dentro do gênero *Salmonella*. Estudos de mutações nestes genes têm demonstrado a eliminação ou diminuição significativa da invasão, enfatizando a importância de todo o complexo para o processo de infecção por *Salmonella* (AMY et al., 2004).

Ginocchio et al. (1994) demonstraram que, em contato com tecido epitelial, linhagens de *S. Typhimurium* formam apêndices na superfície celular, aparentemente essenciais aos processos de penetração em células não fagocitárias, uma vez que bactérias com mutações nos genes *inv* (genes que conferem capacidade invasiva à *Salmonella*) não formam estas estruturas, tornando-se avirulentas.

A capacidade de colonização de órgãos internos (fase sistêmica da infecção por *Salmonella*) é característica dos sorovares adaptados a hospedeiros humanos e animais. Também nesse caso, existem evidências experimentais de que esta adaptação foi possível através da aquisição de genes determinantes de fatores de virulência (HENSEL et al., 1997; BÄUMLER et al., 1998).

Outra característica genética que é comum aos sorovares associados à maior virulência é a presença do operon *spv* ("*Salmonella* Plasmid Virulence"). O operon *spv*, composto por cinco genes (*spvABCDR*), possui genes essenciais para a fase sistêmica da infecção causada por *S. Cholerasuis* em suínos, *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* em galinhas, *S. Dublin* em bovinos, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* em ratos (GULIG et al., 1993).

Análises genéticas têm demonstrado a presença desses genes em isolados de outros sorovares associados à doença sistêmica em animais de sangue quente e em humanos (WOODWARD et al., 1989; REXACH et al., 1994). A ocorrência do operon *spv* em isolados do sorovar *S. Typhimurium* em pacientes humanos também é um forte indicativo da importância destes genes para a fase sistêmica no homem. Entretanto, também existem mecanismos de patogenicidade independentes do operon *spv*, como é o caso dos sorovares tifóides Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B e Sendai que não possuem genes desse operon (AABO et al., 2000).

Os sintomas da infecção em humanos, causados pela ingestão de alimento contaminado por estes microrganismos, aparecem entre 12 e 48 horas, incluindo náuseas, vômito e diarreia, sendo que cerca de 50% dos indivíduos afetados apresentam febre (JAY, 2000).

2.6 Veículos de contaminação no cenário atual

O aumento da incidência de surtos de toxinfecções alimentares por *Salmonella* em diversos países tem chamado a atenção dos órgãos de saúde pública, sendo que as investigações epidemiológicas identificam o consumo de ovos ou de alimentos contendo ovos, como responsáveis pela maioria desses surtos. Sendo assim, os alimentos de origem animal são considerados os maiores reservatórios e veículos de contaminação por *Salmonella* (TONDO et al., 2005).

Na Inglaterra, a carne de frango tem sido referida como um importante veículo de *Salmonella* Enteritidis, enquanto que outros países do

Reino Unido citam ovos ou alimentos contendo ovos como a principal origem do microrganismo (KANTAMA & JAYANETRA, 1996). A redução na incidência de Salmonelose constitui fator importante na prevenção da contaminação em plantas de abate e no processamento de produtos de origem avícola. Com relação à carne de frango, sabe-se que mesmo um pequeno número de animais inicialmente infectados pode causar a contaminação de toda uma linha de abate, representando uma ameaça à saúde pública em casos onde as carcaças não são processadas corretamente. Assim, em frangos de corte, os atuais métodos de abate e práticas de processamento podem disseminar microrganismos de uma carcaça para outra, permitindo que o consumo dessas carnes introduza agentes patogênicos na cadeia alimentar humana (PIERSON, 1995).

Valenciano et al. (2000) relataram um surto de gastroenterite e febre tifóide provocado por *S. Panamá* e *S. Typhi*, respectivamente, ocorrido durante uma festa em um restaurante flutuante, em 1998, na França. Dos 199 convidados, 133 manifestaram gastroenterite e 27 tiveram febre tifóide. Os alimentos veiculadores nos dois casos foram frango ou arroz (servidos juntos). De acordo com os autores, muito embora o frango não seja reservatório de *S. Typhi*, a contaminação pode ter sido causada durante a manipulação por portador saudável e uso de água com contaminação fecal, bombeada diretamente do Rio Sena.

Tsuji et al. (2000) relataram de um surto por *S. Enteritidis* com cerca de 206 pessoas acometidas devido ao consumo de bolos vendidos por oito veículos ambulantes em Okayama e arredores, no Japão. O bolo

envolvido no surto havia sido elaborado com creme preparado à base de manteiga e ovos.

Já Taormina et al. (1999) mencionam a ocorrência de 1917 casos confirmados de Salmonelose associados ao consumo de sementes e brotos de alfafa e mostarda, causados por vários sorovares em países como Reino Unido, Estados Unidos, Suécia, Finlândia, Canadá, entre os anos de 1988 e 1998.

No Brasil, a legislação Federal do Ministério da Saúde (RESOLUÇÃO Nº 12 DE 02 DE JANEIRO DE 2001 – MS) exige ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de amostra de qualquer alimento comercializado, sendo que a pesquisa desse microrganismo é preconizada para praticamente todos os alimentos (BRASIL, 2001).

Por outro lado, o Brasil dispõe de poucos dados epidemiológicos sobre doenças transmitidas por alimentos (DTA), sendo raras as publicações científicas nesse sentido.

O Estado do Paraná dispõe de dados importantes, embora a subnotificação também seja uma realidade nesse Estado. Entre 1978 e 1997, 67,1% dos surtos de DTA ocorridos no Paraná foram de origem bacteriana, sendo que a *Salmonella* spp. foi isolada em 20,3% dos surtos. A partir de 1995, a Salmonelose passou a ser a principal DTA notificada no Paraná (CAMARGO et al., 1998b), sendo que em 1998, 57,1% e 31,2% dos surtos analisados laboratorialmente identificaram *Salmonella* spp. e *S. aureus* enterotoxigênicos, respectivamente (CAMARGO et al. , 1999). Os alimentos mais freqüentemente

envolvidos em surtos alimentares no Paraná, em 1998, foram as preparações mistas, entre as quais figurava a “salada de maionese”.

O laboratório LAPA/LACEN analisou, no período de janeiro de 1996 a abril de 1997, 161 alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Paraná. Os agentes etiológicos responsáveis por esses surtos foram identificados em 52 (32,3%) amostras, sendo a *Salmonella* spp. indicada como responsável por 44,2% dos surtos. Os alimentos mais envolvidos nesses surtos foram carnes e derivados (28,9%) e maionese (23,1%) (CAMARGO et al., 1998a).

Já Souza et al. (1999), em levantamento junto à Vigilância e Fiscalização no Município do Rio de Janeiro, no período de janeiro de 1993 a outubro de 1998, constataram a ocorrência de 39 notificações de alimentos contaminados por *Salmonella* spp., dos quais 14 estavam envolvidos em surtos. Observaram ainda, que 59,1% dos casos estavam relacionados ao consumo de carne e destes, 38,5% ao consumo de carne de aves.

Costalunga & Tondo (2002) relataram que a *Salmonella* spp. foi responsável por 35,7% dos 323 surtos alimentares investigados no Rio Grande do Sul no período de 1997 a 1999, sendo a “maionese caseira” o alimento mais envolvido nesses surtos, tanto na forma de saladas (32,4%) como na forma de coadjuvante de outros alimentos de preparação caseira (2,2%).

Geimba et al. (2004) demonstraram que a *S. Enteritidis* foi o principal sorovar isolado de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul, no período de 1999 a 2000. Os produtos de origem animal foram os principais alimentos envolvidos nos surtos investigados.

2.7 O sorovar *S. Enteritidis*

Salmonella Enteritidis tem sido apontada como a principal causa de surtos de doenças alimentares em diversos países (NASTASI & MAMMINA, 1996; NYLEN et al., 1999; CDC, 2000). No Brasil, este sorovar passou a ser freqüentemente isolado a partir de casos de Salmonelose humana no ano de 1993, sendo isolado em diversos tipos de alimentos envolvidos em surtos (ARAÚJO et al., 1995; KAKU et al., 1995; TAVECHIO et al., 1996; SANTOS & KUPEK, 2000; COSTALUNGA & TONDO, 2002).

Parra (1994), a partir de dados do *Royal Institute of Veterinary Medicine*, na Holanda, relata que a proporção de casos nos quais a *S. Enteritidis* foi identificada como causa de Salmonelose em humanos aumentou de 8,2 para 33,5% entre 1988 e 1992.

No Brasil, segundo Solari et al. (1997), entre 5.686 amostras de *Salmonella* isoladas de aves em diferentes Estados (GO, MG, MT, PI, PR, RJ, RS e SP), no período de 1992 a 1996, foram encontrados 58 sorovares, sendo que 61,7% dos isolados foram sorotipificados como *S. Enteritidis*.

Tavechio et al. (1996) verificaram que a *S. Enteritidis* correspondeu a 1,2% em 1991, 2% em 1992, 10% em 1993, 43% em 1994 e 65% em 1995, das 5490 linhagens isoladas de diferentes fontes, em São Paulo, demonstrando que o aumento do isolamento desse microrganismo ocorreu em diferentes estados do Brasil, no mesmo período.

Segundo dados da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, em 1990, *S. Typhimurium* foi isolada em 86% dos alimentos envolvidos em Salmoneloses, enquanto que *S. Enteritidis* não foi encontrada. Porém, já no

ano de 1993, este sorovar foi isolado em 64% dos alimentos relacionados aos surtos, enquanto que a *S. Typhimurium* foi encontrada em somente 4% desses alimentos. No período de 1999 a 2000 o sorovar Enteritidis se manteve predominante, uma vez que 76 (97%) das *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos no Rio Grande do Sul, pertenciam a esse sorovar (GEIMBA et al., 2004).

Assim, a exata caracterização desse sorovar é de particular importância para o estabelecimento de correlações entre surtos de Salmonelose em humanos e a presença de *S. Enteritidis* em alimentos, principalmente nos de origem animal (LIEBISCH & SCHWARZ, 1996).

2.8 Resistência a antimicrobianos

O uso extensivo de antimicrobianos como aditivos em rações animais e no controle e tratamento de infecções bacterianas é considerado uma das principais causas do aumento da resistência a essas drogas (JOHN et al., 1997; GUSTAFON & BOWEN, 1997). Um exemplo representativo desse problema é a *S. Typhimurium* DT 104, a qual freqüentemente causa problemas na indústria de alimentos e apresenta resistência a vários antimicrobianos (THRELFALL et al., 1992). Esse microrganismo já esteve envolvido em surtos alimentares, enfatizando o perigo da disseminação de linhagens patogênicas multi-resistentes (THRELFALL, 2002).

Mesmo que a resistência a antimicrobianos de linhagens de *S. Enteritidis* seja considerada baixa quando comparada ao aumento significativo da resistência apresentada por algumas linhagens de *S. Typhimurium* (YANG

et al., 2002), a observação do aumento da resistência em linhagens de *S. Enteritidis* é bastante importante, uma vez que esse sorovar tem sido apontado como o principal agente de Salmonelose humana em muitos países, na última década (RODRIGUE, et al., 1990, HERIKSTAD et al., 2002).

Yang et al. (2002) avaliaram a resistência a antimicrobianos de 14 linhagens de *S. Enteritidis* e de 22 linhagens de *S. Typhimurium* isoladas de animais na Coreia. Apenas 21% das amostras de *S. Enteritidis* apresentaram alguma resistência, enquanto que todas as 22 amostras de *S. Typhimurium* foram resistentes a pelo menos um dos agentes testados.

Cruchaga et al. (2001) analisaram 125 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos no ano de 1998, na Espanha quanto à susceptibilidade a antimicrobianos e observaram resistência a pelo uma das 12 drogas testadas em 41% das amostras.

Kiessling et al. (2002) também salientaram a baixa incidência de resistência múltipla em linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos no período de 1999 a 2000, nos EUA. Entre as 35 amostras, somente uma se mostrou resistente a mais de dois antimicrobianos.

Embora o sorovar *S. Enteritidis* seja apontado como o principal agente responsável por doenças alimentares no RS durante os últimos anos (GEIMBA et al., 2004), há pouca informação sobre a prevalência e resistência a antimicrobianos de *S. Enteritidis* envolvidas em surtos de doenças de origem alimentar no Estado, sendo que um dos poucos registros a esse respeito pode ser encontrado no trabalho de Oliveira et al. (2005).

A resistência a antimicrobianos também pode ser utilizada em estudos epidemiológicos, como método de tipificação, uma vez que a disseminação de linhagens resistentes pode ser monitorada através de antibiogramas (THRELFALL & FROST, 1990; OLSEN et al., 1993).

2.9 Prevenção e controle da contaminação de alimentos

O controle das contaminações por *Salmonella* é necessário, não só para evitar problemas de saúde pública, como também para adequar as indústrias de alimentos às exigências do mercado nacional e internacional, tendo em vista que os países desenvolvidos, que são responsáveis pela compra de grande parte dos produtos brasileiros, passaram a exigir melhor qualidade microbiológica, especialmente em relação à presença de *Salmonella* (VILLA, 1998).

Dados da Secretária da Saúde do Rio Grande do Sul apresentam como principais causas dos surtos de Salmonelose ocorridos no Estado em 2000, a contaminação da matéria-prima, temperaturas de processamento inadequadas e as condições de higiene insatisfatórias de equipamentos e utensílios usados na preparação dos alimentos (RIO GRANDE DO SUL, 2001).

Sendo assim, o controle de infecções por *Salmonella* spp. depende primariamente dos padrões de higiene aplicados nos setores de alimentação, além da utilização de outros recursos durante o processamento dos alimentos, como por exemplo, a utilização de tratamentos térmicos, técnicas de exclusão competitiva, utilização de ácidos orgânicos, entre outros (BANWART, 1989; HOSEIN & DUERDEN, 1994). Como consequência

da gravidade do problema, muitos estudos vêm sendo realizados procurando reduzir ou solucionar o problema de contaminação por *Salmonella*, seja na criação, abate ou processamento. Uma das formas de controle de microrganismos patogênicos em indústrias de alimentos é a utilização do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC). Esse sistema visa a análise crítica de cada etapa do processamento de alimentos e a identificação dos perigos que realmente necessitam de controle (SIMONSEN et al., 1987).

A adoção de medidas rigorosas no sistema produtor de carne, que incluem a implementação do APPCC, o controle da saúde do rebanho, transporte dos animais, práticas de abate, processamento tecnológico, transporte de carnes e derivados, armazenamento e comercialização, visam diminuir os níveis de contaminação do produto final. Essas medidas devem ser estendidas à fiscalização dos estabelecimentos e fornecedores.

Órgãos relacionados à saúde pública, assim como laboratórios prestadores de serviços também devem contribuir para a prevenção de Salmoneloses, tentando identificar as possíveis falhas ocorridas desde a produção até o consumo dos alimentos (HOSEIN & DUERDEN, 1994). Entretanto, os métodos tradicionalmente utilizados muitas vezes não são capazes de realizar tal tarefa devido aos limites de detecção (sensibilidade) ou capacidade de discriminação entre as *Salmonella* spp. e outros microrganismos ou mesmo entre diferentes linhagens desta mesma bactéria.

Além disso, o sistema de saúde pública necessita de métodos que auxiliem na identificação das fontes de contaminação de microrganismos

patogênicos, além de estudos de incidência, nível endêmico, prevalência e evolução de surtos.

Para atingir tais objetivos e alcançar uma prevenção efetiva das Salmoneloses, é preciso utilizar técnicas que tenham a capacidade de discriminar linhagens relacionadas e não relacionadas epidemiologicamente, ou seja, correlacionar microrganismos isolados de locais e fontes distintas. Muitas dessas técnicas utilizam os princípios da biologia molecular e são empregadas na tipificação dos microrganismos.

2.10 Tipificação Molecular

A utilização de métodos moleculares para a identificação e diferenciação de linhagens de microrganismos patogênicos apresenta diversas vantagens sobre os métodos convencionais, uma vez que demonstram maior rapidez, sensibilidade e especificidade. Aplicando esses métodos na investigação de surtos, a correlação entre os mesmos pode ser estabelecida, assim como a fonte dos microrganismos responsáveis ser identificada.

De acordo com Millemann et al. (1995), os sistemas de tipificação molecular podem ser empregados para a investigação de surtos, confirmação e delineamento dos perfis de transmissão de uma ou mais linhagens, formulação de hipóteses sobre a origem e veículos de transmissão destas linhagens e monitoração de seus reservatórios. Conforme os mesmos autores, a análise molecular é útil também para a realização de levantamentos epidemiológicos e avaliação de medidas de

controle, através da documentação da ocorrência de determinados sorovares ao longo do tempo.

Diversos estudos moleculares sugerem que um número limitado de linhagens de *S. Enteritidis* com características genéticas semelhantes vêm causando surtos em humanos (POWELL et al., 1994; GONZALEZ-HEVIA & MENDOZA, 1995; THONG et al., 1995; MURAKAMI et al., 1999; TSEN & LIN, 2001). De um modo geral, o envolvimento de linhagens específicas nos surtos de Salmonelose indica que essas *S. Enteritidis* teriam características de virulência que possibilitariam sua disseminação entre determinadas populações. Segundo Hunter (1990), os métodos de tipificação devem satisfazer a três critérios principais: poder discriminatório, reprodutibilidade e capacidade de tipificação de diferentes microrganismos. O poder discriminatório consiste na capacidade de diferenciar organismos relacionados e não relacionados. A reprodutibilidade é a capacidade de um método produzir o mesmo resultado quando aplicado repetidamente, enquanto a capacidade de tipificação refere-se à proporção de isolados que podem ser caracterizados através de determinado método (OLSEN et al., 1993; MENDOZA & LANDERAS, 1999).

Alguns critérios secundários também devem ser considerados. O método deve ser de fácil execução e interpretação dos resultados. Além disso, o sistema de tipificação ideal deve apresentar custo acessível e não necessitar de equipamentos complexos com o objetivo de ser aplicado a um grande número de isolados. Embora algumas técnicas genotípicas necessitem de múltiplos passos e/ou equipamentos específicos e apresentem custo

relativamente alto em relação aos métodos fenotípicos, a maioria dos métodos genotípicos apresenta maior poder de discriminação, além de permitirem a avaliação objetiva dos resultados e ainda a análise estatística dos dados (MENDOZA & LANDERAS, 1999).

Métodos fenotípicos, tais como, sorotipificação, fagotipificação e susceptibilidade a antimicrobianos foram os primeiros a serem aplicados na caracterização de *Salmonella*. Esses métodos tradicionais ainda têm um papel importante em epidemiologia, pois fornecem informações básicas, sobre as quais os métodos de tipificação molecular podem ser aplicados.

A escolha das técnicas de tipificação mais adequadas deve atender aos critérios citados anteriormente e deve considerar o fato de que a utilização de um único método de tipificação pode ser insuficiente para a identificação precisa de uma linhagem (THONG et al., 1995). Dentre os métodos de tipificação bastante utilizados na caracterização de *Salmonella* spp. pode-se citar a PCR-Ribotipificação e a RAPD, as quais têm seu princípio de aplicação, suas principais vantagens e desvantagens descritas a seguir.

2.10.1 PCR- Ribotipificação

A PCR-ribotipificação foi sugerida como técnica substitutiva à ribotipificação clássica. Essa técnica é baseada na amplificação de seqüências intergênicas do *operon* ribossomal, os quais estão presentes em uma a onze cópias no genoma bacteriano (LUZ et al., 1998). Embora existam seqüências homólogas para genes rRNA, as regiões espaçadoras entre as regiões 16S e 23S apresentam variações que podem ser utilizadas para caracterizar bactérias

em nível de espécie, sorovar e linhagens (BAUDART et al., 2000). Diversos autores vêm utilizando essa técnica para tipificação de *Salmonella* (NASTASI & MAMMINA, 1995; NASTASI & MAMMINA, 1996; LANDERAS & MENDOZA, 1998; MILLEMANN et al., 2000; CERRO et al., 2002). Nastasi & Mammina (1995), ao estudarem 45 linhagens de *Salmonella* Typhimurium isoladas de surtos ocorridos na Itália, classificaram a PCR-ribotipificação como um método de fácil execução, rápido e reprodutível. Baudart et al. (2000) encontraram apenas um perfil de PCR-Ribotipificação entre 156 *S. Typhimurium* coletadas de amostras ambientais e de efluentes. Da mesma forma, Landeras & Mendoza (1998) agruparam 65 isolados de *S. Enteritidis* em um mesmo perfil de PCR-Ribotipificação apesar de terem sido isoladas em diferentes localidades. Já Nastasi & Mammina (1996) encontraram 15 diferentes perfis ao aplicarem essa técnica de tipificação em 405 isolados de *S. Enteritidis* na Itália.

2.10.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

No RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), seqüências iniciadoras escolhidas aleatoriamente ligam-se a múltiplos locais ao longo do genoma, sem a necessidade de nenhum conhecimento prévio da seqüência de DNA que se pretende analisar, produzindo um perfil de produtos amplificados característicos de uma determinada amostra (MEUNIER & GRIMONT, 1993). O RAPD tem sido aplicado para análise genética de *Salmonella* e tem sido recomendado como uma alternativa a outros métodos de tipificação (van LITH & AARTS, 1994; BEYER et al., 1998; JOHNSON et al., 2001). Quando seqüências iniciadoras adequadas são utilizadas, as análises por RAPD

fornecem resultados rápidos e reprodutíveis, sendo considerada uma importante ferramenta na tipificação de *S. Enteritidis* (BETANCOR et al., 2004).

Em um estudo com 125 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de um surto alimentar, Kantama & Jayanetra (1996) encontraram 8 perfis de RAPD, sendo que um deles agrupou 93% das amostras.

Ling et al. (1998) também utilizaram o RAPD na análise de 275 amostras de *S. Enteritidis*, isoladas entre 1986 e 1996, em Hong Kong. Esses autores obtiveram seis perfis, com dois a onze fragmentos de DNA, com pesos moleculares entre 0,5 e 4 kb.

Betancor et al. (2004) utilizou cinco seqüências iniciadoras para caracterizar 62 isolados de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos relacionados com surtos ocorridos no Uruguai. Em outro estudo, Laconcha et al. (1998) encontraram cinco perfis de RAPD entre 39 isolados de *S. Enteritidis* relacionadas e não relacionadas com gastroenterites alimentares, sendo que 75% das amostras foram agrupadas em um único perfil.

Lin et al. (1996) aplicaram a técnica de RAPD a 29 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de diversas fontes. Eles trabalharam inicialmente com 65 seqüências iniciadoras. Destas, seis foram selecionadas e empregadas frente as amostras previamente caracterizadas por fagotipificação, ribotipificação e Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE), sendo 27 coletadas em diferentes locais dos Estados Unidos e uma da Alemanha. Os autores verificaram que os diferentes iniciadores produziram diferentes padrões de RAPD (entre três e cinco) e, através da combinação dos perfis obtidos com as seis seqüências iniciadoras selecionadas, foi possível identificar um total de 14 perfis. A união

das quatro técnicas empregadas (RAPD, PFGE, fagotipificação e ribotipificação) forneceu 23 subgrupos dentre os 29 isolados de *S. Enteritidis*. Para os autores, entretanto, quando se considera poder discriminatório e facilidade de aplicação, a RAPD emerge como uma técnica molecular particularmente atrativa.

São considerados pontos importantes na execução da RAPD, os protocolos de amplificação (particularmente a temperatura de anelamento), as diferentes DNA polimerases utilizadas e a composição das soluções empregadas nas reações de amplificação. Com isso, a padronização da técnica constitui passo importante para sua utilização como ferramenta de avaliação epidemiológica (HILTON et al., 1997).

Mendoza e Landeras (1998) também avaliaram diferentes iniciadores para RAPD frente a 65 amostras de *S. Enteritidis* isoladas na Espanha, previamente testadas por ribotipificação. A maioria dos iniciadores gerou perfis não reprodutíveis e/ou fragmentos amplificados sem boa resolução. Entretanto, com nove dos iniciadores testados, a reprodutibilidade obtida foi de 100%.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras de *Salmonella* spp., identificação e sorotipificação

As culturas de *Salmonella* sp. (n= 85) utilizadas nesse trabalho foram isoladas a partir de amostras de alimentos envolvidos em surtos de Salmonelose ocorridos em diversos municípios do Rio Grande do Sul, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2002 (APÊNDICE A). Os surtos foram investigados pela Divisão de Vigilância Sanitária do RS (DVS/RS), ou Vigilâncias Sanitárias Municipais, que coletaram amostras de alimentos suspeitos, os quais foram enviados para o Laboratório Central do Rio Grande do Sul (LACEN/RS) ou laboratórios credenciados para a realização do isolamento bacteriano e caracterização bioquímica de acordo com Food and Drug Administration (FDA, 1992).

Após a caracterização bioquímica, as amostras de *Salmonella* sp. foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) para a realização da sorotipificação, segundo os métodos descritos por Kauffman (1972).

3.2 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos

As amostras de *S. Enteritidis* (n=79) isoladas dos alimentos envolvidos nos surtos foram conduzidas ao Instituto de Ciência e Tecnologia de

Alimentos (ICTA/UFRS), onde foram submetidas ao teste de susceptibilidade a dez agentes antimicrobianos, através do método de difusão em ágar, segundo o protocolo descrito por National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000). Todos os discos contendo antimicrobianos utilizados foram fornecidos por Newprov (Pinhais, Paraná).

Os antimicrobianos testados foram escolhidos de acordo com Breuil et al. (2000) e suas respectivas concentrações estão descritas a seguir: ampicilina (AMP), 10 μ g; tetracilina (T), 30 μ g; neomicina (NEO), 10 μ g; canamicina (K), 30 μ g; sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), 25 μ g; gentamicina (GEN), 10 μ g; ácido nalidíxico, 30 μ g; cloranfenicol (C), 30 μ g; estreptomicina (S), 10 μ g; sulfazotrim (SUL), 25 μ g.

Os padrões de susceptibilidade foram determinados de acordo com os diâmetros e referência descritos no NCCLS (2000). *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle.

Foram construídos perfis numéricos através da atribuição, para cada um dos dez antimicrobianos testados, do valor 1 para a resistência, valor 2 para a resistência intermediária e valor 3 para a sensibilidade.

3.3 Caracterização Molecular

A tipificação molecular foi realizada no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS) e na Fundação Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre (FFFCMPA). Foram utilizadas duas técnicas moleculares, ambas empregando a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR): PCR-Ribotipificação e RAPD.

3.3.1 Extração de DNA

Para a PCR-Ribotipificação, o DNA genômico foi extraído por lise enzimática, utilizando lisozima seguida de purificação com fenol – clorofórmio e posterior precipitação com etanol (SAMBROOK et al., 1989). Para a RAPD, o DNA genômico foi extraído através de tratamento térmico. Ambos métodos são descritos a seguir.

3.3.1.1 Lise enzimática

Uma colônia de cada isolado de *S. Enteritidis* foi cultivada em 1mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth, Difco, Detroit, USA) durante 18 horas a 37°C. Em seguida, as culturas foram centrifugadas a 2000g por quatro minutos em um microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C, à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuscitado em 444µL de TE (10mM Tris HCl, pH 8,0, 1mM EDTA, pH 8,0), onde foram adicionados 30µL de lisozima (50mg/mL, Pharmacia Biotech, EUA). A suspensão foi então homogeneizada em um agitador tipo vortex e foi incubada a 4°C, por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 25µL de SDS 10% e 1,25µL de proteinase K (20mg/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil). Em seguida, as suspensões foram colocadas em um banho-maria, a 55°C por 30 minutos. Transcorrido este período, foram adicionados 500µL de fenol-clorofórmio (1:1), pH 8,0, sendo então as amostras homogeneizadas por 5 a 10 segundos e centrifugadas a 16000 g, por 4 minutos. Um volume de 450µL da fase aquosa foi transferido para um tubo de microcentrífuga, no qual foram adicionados 450µL de fenol-clorofórmio, repetindo os passos de homogeneização e centrifugação. Na etapa seguinte da extração, 400µL da fase aquosa foram transferidos para novos tubos de

microcentrífuga, nos quais foram adicionados 400 μ L de clorofórmio. Após nova homogeneização e centrifugação a 16000g, por 2 minutos, a fase aquosa foi removida e adicionada de 35 μ L de acetato de sódio 3M, pH 7,0 e 350 μ L de isopropanol gelado, sendo então incubadas a -20°C , por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram lavadas com 1mL de etanol 80% e centrifugação a 16000g, por 10 minutos. As suspensões foram submetidas a mais uma centrifugação a 16000g, por 40 minutos, e o precipitado contendo o DNA foi ressuspenso em 50 μ L de TE.

3.3.1.2 *Lise por tratamento térmico*

Uma colônia de cada isolado de *S. Enteritidis* foi cultivada em 1mL de caldo TSB (Trypic Soy Broth, Difco, Detroit, USA) durante 18 horas a 37°C . Após incubação, as culturas foram centrifugadas a 5000g por 4 minutos em microcentrífuga Eppendorf modelo 5415C, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 1mL de TE (10mM Tris HCl, pH 8,0, 1mM EDA pH 8,0). Após nova centrifugação, essa operação foi repetida novamente. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de TE e submetido à fervura, por 5 minutos, sendo então centrifugado a 5000g, por 20 segundos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de microcentrífuga e mantido a -20°C por não mais de 24 horas, até a realização das análises de RAPD.

3.3.2 PCR-Ribotipificação

3.3.2.1 Seleção das seqüências iniciadoras

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nessa técnica foram previamente propostos por Jensen et al. (1993) e são específicos para a amplificação das regiões hipervariáveis entre os genes 16S e 23S do operon ribossomal. As seqüências de bases desses oligonucleotídeos são as seguintes: 5' CAA GGC ATC CAC CGT GT 3' e 5' GTG AAG TCG TAA CAA GG 3'.

3.3.2.2 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada de acordo com as condições descritas por Jensen e Hubner (1996). Em um volume final de 25 μ L de solução contendo 2,5 μ l de tampão de reação (100 mmol L⁻¹ Tris HCl, 750 mmol L⁻¹ KCl, pH 8,8), 1 μ L de MgCl₂ (50 mM), 2 μ L de 10 mM dNTPs (5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 μ L de cada seqüência iniciadora (20 μ mol/ μ L), 1U de *Taq* DNA polimerase 5U/ μ L (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 14,1 μ L de água bidestilada e deionizada e 2 μ L de DNA bacteriano purificado. As amostras foram submetidas às seguintes condições de amplificação: 94°C por 2 min, seguido por 25 ciclos de 94°C por 5 min (desnaturação), 55°C por 4 min (anelamento), 72°C por 1 min (polimerização) e a extensão final a 72°C por 30 min. Cada reação de PCR incluiu um controle negativo sem o DNA molde e cada amostra foi submetida a, pelo menos, duas análises por PCR-Ribotipificação.

3.3.3 RAPD

3.3.3.1 Seleção das seqüências iniciadoras

A seqüência iniciadora conhecida como P1254 (5' CCGCAGCCAA 3') foi utilizada nas análises de RAPD. Essa seqüência foi descrita por Lin et al. (1996) e foi utilizada por Landeras & Mendoza (1998) para tipificação de *S. Enteritidis*.

3.3.3.2 Reação de PCR

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 μ L de solução contendo 2,5 μ L de tampão de reação (100 mmol L⁻¹ Tris HCl, 750 mmol L⁻¹ KCl, pH 8,8), 1,75 μ L de 50mM MgCl₂, 0,5 μ L de 10 mM dNTPs (5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 μ L da seqüência iniciadora (20 ρ mol/ μ L), 1U de *Taq* DNA polimerase 5U/ μ L (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 16,05 μ L de água bidestilada e deionizada e 2 μ L de DNA bacteriano extraído por fervura. As condições de reação foram as seguintes: um ciclo a 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 1 min (desnaturação), 30°C por 1 min (anelamento), 72°C por 1 min (polimerização) e a extensão final a 72°C por 5 minutos. Cada reação de PCR incluiu um controle negativo sem o DNA molde.

Para verificar a reprodutibilidade da RAPD, as amplificações foram realizadas em dois termocicladores diferentes: um termociclador modelo Perkin Elmer Gene Amp System 2400 (Perkin Elmer, USA) com capacidade para 24 amostras e em um termociclador modelo PTC- 100TM (MJ Research, USA) com capacidade para 60 amostras. A reprodutibilidade dos perfis gerados pelo RAPD foi avaliada testando, pelo menos, três vezes cada amostra.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose nas concentrações de 1% e 1,5% para a PCR-Ribotipificação e RAPD, respectivamente. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5µg/mL) e visualizados sobre transluminador.

O poder discriminatório das duas técnicas foi testado através da sua aplicação frente a outros sorovares de *Salmonella* (*S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Infantis*, *S. Javiana* e *S. enterica subsp. enterica*, 1,4,5).

3.3.4 Critérios para interpretação dos resultados das análises por PCR-Ribotipificação e RAPD

No intuito de padronizar a interpretação dos resultados das análises moleculares, pequenas diferenças na intensidade das bandas, bem como bandas fracas não foram consideradas na definição dos perfis. Além disso, foram considerados perfis distintos aqueles com diferença de uma única banda, ou seja, foram consideradas pertencentes ao mesmo perfil amostras que apresentaram padrão de migração idêntico. Nas análises de RAPD, apenas os fragmentos com peso molecular entre 200 a 1000pb foram considerados para definição dos perfis, uma vez que bandas fora deste intervalo eram pouco reprodutíveis.

3.4 Análise Estatística

A capacidade de discriminação dos métodos de tipificação (susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-Ribotipificação e RAPD) foi avaliada

através da determinação numérica do Índice de Discriminação (D) segundo o método descrito por Hunter & Gaston (1988) (APÊNDICE B).

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{n=1}^s n_j(n_j-1)$$

onde:

s = número total de linhagens diferentes

n_j = número de isolados de cada linhagem

N = número total de isolados dentro da população

As análises foram realizadas com o auxílio do Núcleo de Assistência em Estatística (NAE) da UFRGS.

4. RESULTADOS

4.1 Sorotipificação

Dentre os 85 isolados investigados, 79 (93%) foram sorotipificados como *S. Enteritidis*, sendo que 42 (95,45%) das 44 linhagens isoladas em 2001 e 37 (90,24%) das 41 linhagens isoladas em 2002 pertenciam a esse sorovar. As outras seis amostras foram sorotipificadas como *S. Javiana* (n=1), *S. Infantis* (n=1), *S. Agona* (n=1), *S. Typhimurium* (n=1) e *S. enterica* sup *enterica* 1,4,5 (n=2), sendo que os sorovares *S. Javiana* e *S. Infantis* foram isolados no ano de 2001. Somente as linhagens de *S. Enteritidis* foram submetidas à tipificação através da análise de susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-Ribotipificação e RAPD.

4.2 Susceptibilidade a antimicrobianos

As percentagens gerais de resistência a antimicrobianos das linhagens de *S. Enteritidis* estudadas nesse trabalho são apresentadas na Tabela 2. As maiores taxas de resistência foram observadas para os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico (21,5%), gentamicina (12,7%) e estreptomicina (11,4%); enquanto que as mais expressivas resistências intermediárias foram observadas para a canamicina (29,1%), neomicina (17,7%) e estreptomicina (13,9%).

TABELA 1: Porcentagens gerais de resistência a antimicrobianos das amostras de *S. Enteritidis* (n=79) isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul, nos anos de 2001 e 2002.

	Susceptibilidade a antimicrobianos (%)									
	AMP	T	NEO	K	SXT	GEN	C	S	NAL	SUL
Sensibilidade	94,9	91,1	75,9	68,4	100	83,5	98,7	74,7	78,5	100
Resistência Intermediária	2,5	8,9	17,7	29,1	0	3,8	0	13,9	0	0
Resistência	2,5	2,53	6,3	2,5	0	12,7	1,3	11,4	21,5	0

ampicilina (AMP); tetraciclina (T); neomicina (NEO); canamicina (K); sulfametoxazol/trimetoprim (SXT); gentamicina (GEN); cloranfenicol (C); estreptomicina (S); ácido nalidíxico (NAL); sulfazotrim (SUL).

Em geral, altas porcentagens de susceptibilidade foram observadas para todos os agentes antimicrobianos testados. A menor porcentagem de sensibilidade (78,5%) foi verificada para o ácido nalidíxico. Os maiores índices de sensibilidade foram observados para ampicilina (94,9%), tetraciclina (91,1%), cloranfenicol (98,7%), sulfametoxazol/trimetoprim (100%) e sulfazotrim (100%).

Comparando a susceptibilidade a antimicrobianos das amostras de *S. Enteritidis* isoladas em 2001 com aquelas isoladas em 2002, pode-se verificar um aumento na porcentagem de resistência aos seguintes antimicrobianos: tetraciclina (de 0% para 5,4%), canamicina (de 2,4% para 2,7%), ácido nalidíxico (de 19,0% para 24,3%) e cloranfenicol (de 0% para 2,7%). Também foram demonstrados aumentos nas resistências intermediárias aos seguintes antimicrobianos: neomicina (de 14,3% para 21,6%), canamicina (de 28,6 para 29,7%), gentamicina (de 2,4% para 5,4%) e estreptomicina (de 7,2 para 21,6%) (TABELA 2).

TABELA 2: Porcentagens de resistência a antimicrobianos das amostras de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul, por ano (2001 e 2002).

Antimicrobiano	Resistência (%)					
	2001 (n=42)			2002 (n= 37)		
	R	I	S	R	I	S
AMP	4,76	4,76	90,48	0	0	100
T	0	9,52	90,48	5,41	8,10	82,49
NEO	7,14	14,3	78,6	5,41	21,62	79,97
K	2,40	28,57	69,05	2,70	29,73	67,57
SXT	0	0	100	0	0	100
GEN	21,43	2,38	76,19	2,70	5,41	91,89
C	0	0	100	2,70	0	97,30
S	11,90	7,15	80,95	10,81	21,62	67,57
NAL	19,05	0	80,95	24,32	0	75,68
SUL	0	0	100	0	0	100

R= Resistência; I= Resistência intermediária; S= sensibilidade
ampicilina (AMP); tetraciclina (T); neomicina (NEO); canamicina (K);
sulfametoxazol/trimetoprim (SXT); gentamicina (GEN); cloranfenicol (C);
estreptomicina (S); ácido nalidíxico (NAL); sulfazotrim (SUL).

A Tabela 3 apresenta os 32 perfis referentes à susceptibilidade das linhagens de *S. Enteritidis* analisadas nesse trabalho. A resistência a pelo menos um dos dez antimicrobianos testados foi verificada em 30 (37,9%) dos 79 isolados de *S. Enteritidis*. A característica de resistência múltipla (aqui

definida como resistência a mais de um agente antimicrobiano) foi observada em 13 (16,5%) isolados. Somente um isolado (4056) apresentou resistência a três drogas (tetraciclina, estreptomicina e ácido nalidíxico) e duas amostras (983 e 5100) mostraram-se resistentes a quatro antimicrobianos (TABELA 3).

TABELA 3: Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no RS, nos anos de 2001 e 2002.

Amostras	Código Numérico	Perfil
22, 1849, 3351	3322333333	1
150,12, 3349, 3447, 3698, 3701 4127, 4129, 4479, 4480, 4481, 5067, 5070	3332333333	2
699	3332313333	3
701	3323333333	4
720, 13	3332313133	5
983	3321313113	6
1054	2233333233	7
1055	1233333333	8
1209, 1211	3213313333	9
2027, 4126, 5069	3333333233	10
2028, 5468	3233333233	11
2035, 3700, 5469	3323333233	12

Continuação TABELA 3: Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no RS, nos anos de 2001 e 2002.

2036, 3695, 4055, 4148, 5471, 5474, 3696,3697	3333333313	13
1085, 1086, 1399,1709, 2387, 2388, 3350, 3834, 3835, 4019, 4051,4053, 4264, 4549, 4550, 4842, 5068, 5162, 5467, 15	3333333333	14
3359	1333333333	15
3436	3313313233	16
3836	3333323333	17
3879	3323333313	18
4056	3133333113	19
4128	3331333333	20
4653	3322313133	21
4657	3333313313	22
4909	3333333133	23
4979	2333333313	24
4981	3333333113	25
5075	3323333213	26
5099	3213333333	27
5100	3122311133	28

Continuação TABELA 3: Perfis de susceptibilidade a antimicrobianos das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas no RS, nos anos de 2001 e 2002.

5464	3332323333	29
5465	3323333333	30
5475	3313333313	31
5476	3322323113	32

Código numérico: 1= resistência, 2= resistência intermediária, 3= sensível. ampicilina (AMP); tetraciclina (T); neomicina (NEO); canamicina (K); sulfametoxazol/trimetoprim (SXT); gentamicina (GEN); cloranfenicol (C); estreptomina (S); ácido nalidíxico (NAL); sulfazotrim (SUL).

O perfil 14, constituído pelas linhagens de *S. Enteritidis* que se mostraram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, agrupou o maior número de isolados (n= 20). O Perfil 13 que representa as amostras resistentes ao ácido nalidíxico e sensíveis às demais drogas testadas agrupou nove amostras.

O índice de discriminação (D) da tipificação por susceptibilidade a antimicrobianos foi 0,90.

4.3 PCR-ribotipificação

A amplificação das regiões espaçadoras entre os genes 16S e 23S agrupou as 79 amostras de *S. Enteritidis* em somente dois perfis (R1 e R2, FIGURA 1), os quais mostraram-se muito similares. O perfil R1 apresentou um padrão de migração composto por quatro fragmentos de DNA (bandas de aproximadamente 300, 400, 600 e 800pb), enquanto que o perfil R2 apresentou somente duas bandas (400 e 600pb). O perfil R1 reuniu 92,4% (n=73) amostras e o Índice de Discriminação dessa técnica foi de 0,14.

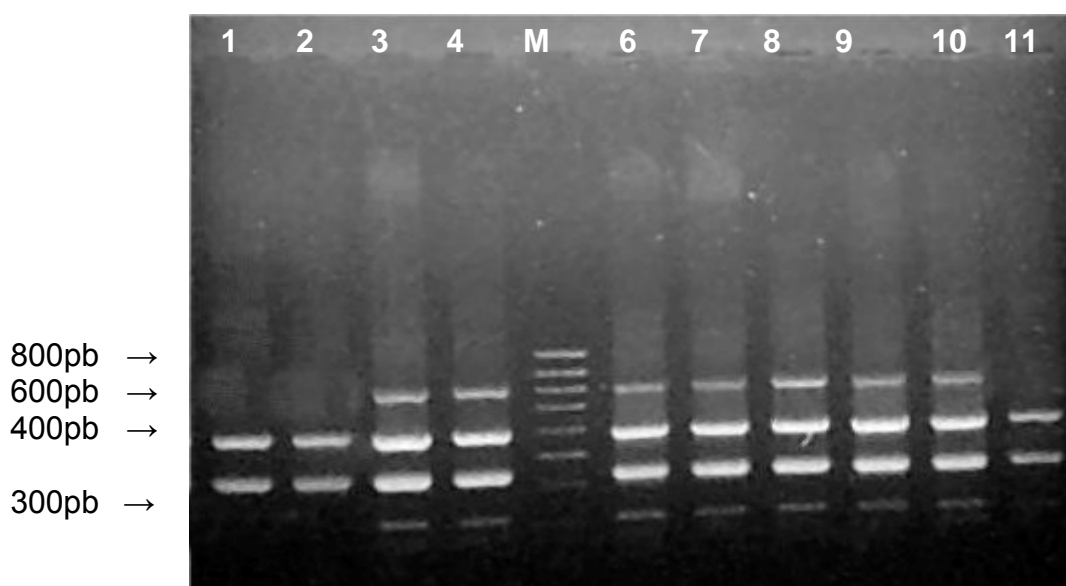


FIGURA 1: Perfis gerados por PCR-Ribotipificação das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Rio Grande do Sul durante os anos de 2001 e 2002. M: indica o marcador de peso molecular (100bp DNA ladder). Colunas 3,4,6,7,8,9 e 10 representam perfil R1. Colunas 1,2 e 11 representam perfil R2.

4.4 RAPD

Quando as linhagens foram submetidas às análises de RAPD, quatro perfis (A, B, C e D) foram encontrados (FIGURA 2), os quais foram compostos por bandas variando de aproximadamente 450 a 900pb. O perfil A agrupou 81% (n=64) dos 79 isolados, enquanto o perfil B reuniu 9% dos isolados (n=7). Os perfis C e D foram constituídos por somente quatro amostras cada um. O valor D para esse método de tipificação foi de 0,33.

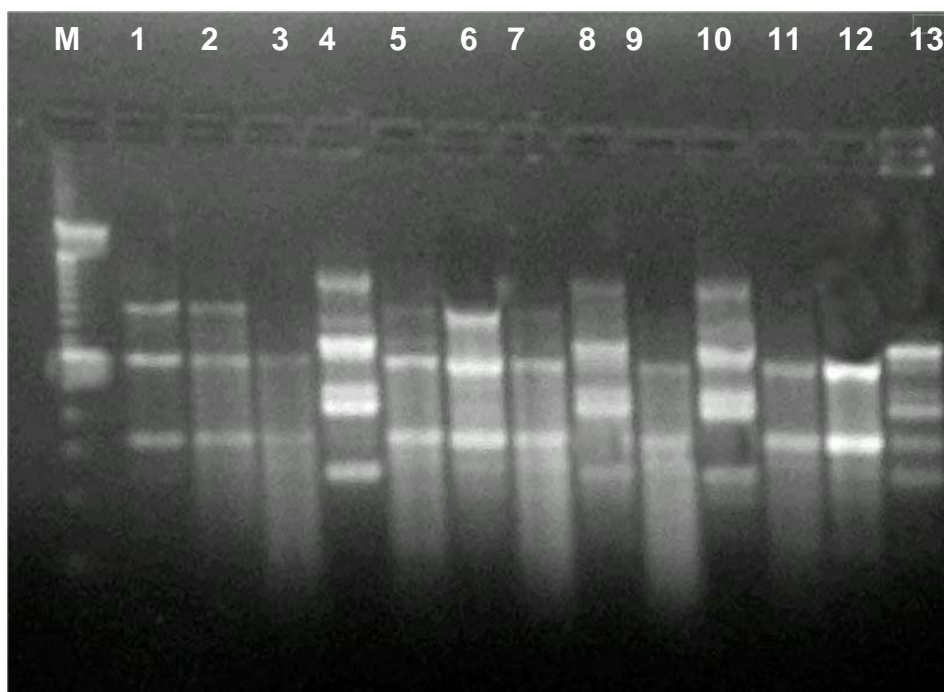


FIGURA 2: Perfis gerados por RAPD das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos de Salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul durante os anos de 2001 e 2002. Os fragmentos de DNA foram gerados usando o primer P1254. M representa o marcador de peso molecular (100bp DNA ladder). Colunas 3, 5, 7, 9, 11 e 12 representam o perfil A. Colunas 1, 2 e 6 representam o perfil B. Colunas 4, 8, e 10 representam o perfil C e a coluna 13 representa o perfil D.

4.5 Reprodutibilidade dos métodos moleculares

Tanto as análises de PCR-Ribotipificação quanto às de RAPD foram consideradas reprodutíveis, uma vez que produziram o mesmo perfil de bandas em diferentes ampliações e em diferentes termocicladores. A presença de bandas fracas ou inespecíficas foi rara na maioria das análises de PCR-ribotipificação. Os perfis foram formados por padrões de bandas bem definidos, tornando possível a diferenciação dos perfis quando foi observada a diferença de uma ou mais bandas.

Nos ensaios de RAPD, a presença de bandas fracas foi mais freqüente, porém não influenciou na capacidade de diferenciação e na reprodutibilidade da técnica, já que, para efeito de tipificação, somente bandas entre 200 e 1000pb foram consideradas. Dentro dessa faixa, todas as linhagens produziram perfis reprodutíveis. A presença ou ausência de uma única banda definiu um perfil distinto.

5. DISCUSSÃO

5.1 Sorotipificação

A *Salmonella* sp. é considerada o principal agente bacteriano responsável por surtos alimentares em muitos países (LACONCHA et al., 2000; MILLEMANN et al., 2000; LOPALCO et al., 2000). Segundo Thong et al (1995), esse microrganismo é responsável por, aproximadamente, três milhões de mortes anualmente, em todo mundo.

Em países, como Polônia (GLÓSNIKA & KUNIKOWSKA, 1994), Estados Unidos (LIN et al., 1996), Grécia (TASSIOS et al., 1997), Itália (MURESU et al., 2001), Inglaterra e País de Gales (LIEBANA et al., 2001) e França (BOUVET et al., 2002) as infecções causadas por *Salmonella* sp. indicam a crescente incidência desse microrganismo como patógeno alimentar, principalmente devido à *S. Enteritidis*, tornando-se, portanto, um grave problema de saúde pública, com implicações sanitárias e econômicas.

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a *S. Enteritidis* foi o sorovar predominante (93%) entre as amostras analisadas. Além desse sorovar, também foram encontrados outros sorovares envolvidos em surtos de Salmonelose alimentar, porém em números muito menos expressivos.

Outros trabalhos também indicam que a incidência de infecções gastrointestinais causadas por *S. Enteritidis* tem aumentado durante as últimas décadas. Na Polônia, a porcentagem de infecções em humanos causadas por

esse microrganismo aumentou de 23,3% em 1962, para 93,8% em 1991 (GLÓSNIKA & KUNIKOWA, 1994). Em um estudo conduzido na Grécia, foi observado um aumento na incidência de *S. Enteritidis* de 25% em 1987 para 78% em 1993 (TASSIOS et al., 1997). Durante o período de 1982 a 1992, na Itália, os isolados de *S. Enteritidis* aumentaram de 2,4% para 57,1% em humanos, e de 0,5% para 22,8% em alimentos, sendo esse aumento atribuído ao consumo de produtos contendo ovos crus ou não cozidos adequadamente (FANTASIA & FILETICI, 1994). Nos EUA, durante as três décadas passadas, o número de infecções por *Salmonella* sp. comunicadas ao CDC (*Centers for Diseases Control and Prevention*) aumentou consideravelmente. Em 1996, foram informados 39.032 casos, o que representou um aumento de 47% em relação ao número de casos relatados em 1972. Nesse período, a *S. Enteritidis* apresentou um aumento na porcentagem de isolamento de 459%, enquanto os outros sorovares apresentaram apenas cerca de 18%. Dentre os alimentos identificados, os ovos e alimentos contendo ovos foram implicados em 79% (n=233) dos 293 surtos investigados (ANGULO & SWERDLOW, 1999).

No Brasil, Kaku et al. (1995) observaram que a *S. Enteritidis* tem sido isolada com freqüência desde 1991, tanto de materiais de origem humana como de alimentos e que, em 1993, esse sorovar já figurava entre os dez mais comuns em nosso país.

No Estado de São Paulo, no ano de 1991, *S. Enteritidis* representou 1,2% das 5490 linhagens isoladas de diversas fontes, aumentando para 2% em 1992, 10% em 1993, 43% em 1994 e 65% em 1995 (TAVECHIO et al., 1996). Segundo Peresi et al. (1998), a *S. Enteritidis* representou, nas últimas décadas,

0,4 a 1% de todos os sorovares isolados de infecções humanas em São Paulo. A partir de 1993, foi verificado um aumento no isolamento desse sorovar, sendo que em 1995, a *S. Enteritidis* passou a ser o sorovar predominante, correspondendo a 64,9% dos isolamentos de material biológico de origem humana e 40,6% de outras origens. Resultados semelhantes foram observados no Rio Grande do Sul, onde, em 1989, o sorovar *S. Enteritidis* foi encontrado em 9% dos alimentos envolvidos em Salmoneloses, chegando a 64%, em 1993 e 97%, no período de 1999 a 2000 (GEIMBA et al., 2004). Nossos resultados demonstram que a *S. Enteritidis* permaneceu como o principal sorovar isolado a partir de alimentos envolvidos em Salmoneloses no RS, no período de 2001 a 2002.

Segundo Costalunga & Tondo (2002), no período de 1997 a 1999, *Salmonella* sp. estava presente em 35,7% dos surtos de origem alimentar, sendo que as principais causas associadas a esses surtos foram matérias – primas sem inspeção (22,92%), principalmente ovos, e os alimentos mantidos a temperatura ambiente por mais de duas horas (20,55%).

A análise da Tabela 1 demonstrou que 30,4% (24/79) das amostras de *S. Enteritidis* isoladas no período desse estudo foram veiculadas por alimentos que continham ovos. Resultados semelhantes foram observados por Peresi et al. (1998), os quais relataram a análise de 23 surtos por *S. Enteritidis* ocorridos na região nordeste do Estado de São Paulo, no período compreendido entre julho de 1993 e junho de 1997. Eles verificaram que em 22 dos 23 surtos, a *Salmonella* foi veiculada por alimentos contendo ovos crus.

Em diversos países, a *S. Enteritidis* vem substituindo outros sorovares identificados como agentes de doenças alimentares em anos anteriores. Observações semelhantes foram feitas por Usera et al. (1994) que descreveram a substituição da *S. Typhimurium* por *S. Enteritidis* em 1990, tornando-se, desde então, o principal sorovar associado a casos de Salmonelose registrados nos Estados Unidos. Uma provável explicação para esse fato pode estar relacionada à rápida disseminação de *S. Enteritidis* em aves causando infecções assintomáticas nos anos 80, nos Estados Unidos, Reino Unido e América do Sul (AGRON et al., 2001). Durante este período, a proporção de casos de Salmonelose atribuídos à *S. Enteritidis* aumentou substancialmente, tornando-se a causa predominante de gastroenterites em diversos países. Esse fato sugere que o rápido aumento da incidência de *S. Enteritidis* pode ter ocorrido devido ao sucesso de campanhas de erradicação das *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, os agentes causais do tifo aviário e da diarreia bacilar em frangos. Essas campanhas podem ter aberto um nicho ecológico que desde então vem sendo ocupado pela *S. Enteritidis* (BÄUMLER et al., 2000).

5.2 Susceptibilidade a antimicrobianos

A análise da resistência a antimicrobianos tem sido bastante utilizada, juntamente com outros métodos de tipificação, para caracterização de *S. Enteritidis* (RODRIGUE et al., 1990; POPPE et al., 1996; TASSIOS et al., 1997; LING et al., 1998; LING & WANG, 2001; GEIMBA et al., 2003).

Um aumento na resistência a antimicrobianos em *Salmonella* spp. isoladas de humanos, animais e alimentos envolvidos em Salmoneloses vem

sendo observado em diferentes partes do mundo (CRUCHAGA et al., 2001; KIESSLING et al., 2002). Esse aumento indica a possibilidade de disseminação de linhagens específicas, as quais podem ter maior potencial de virulência, tornando mais difícil o tratamento dessas doenças alimentares (CRUCHAGA et al., 2001). A resistência das *Salmonella* aos antimicrobianos pode ser atribuída a uma série de possíveis fontes, incluindo a resistência natural de certas espécies a determinadas drogas (SHERIDAN & MCDOWELL, 1998), transferência de resistência entre espécies e o uso de doses subterapêuticas em rações animais para aumentar a produtividade (D'AOUST et al., 1992; BENNISH & LEVY, 1995).

Dados dos órgãos de Vigilância Sanitária dos EUA indicaram um aumento da incidência de isolados de *Salmonella* resistentes: de 16%, no período de 1979-80, para 29%, no período de 1989-90 (MCDONALD et al., 1987; THRELFALL et al., 1994). Nesse mesmo país, também foi observado um aumento da resistência múltipla a ampicilina, cloranfenicol ou canamicina, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina entre sorovares específicos, nos últimos anos (YAN et al., 2003).

No nosso estudo, os maiores índices de resistência foram encontrados para a gentamicina (12,7%), estreptomicina (11,4%) e ácido nalidíxico (21,5%). Para monitorar a resistência a antimicrobianos, Molbak et al. (2002) analisaram 2.546 *S. Enteritidis* isoladas na Dinamarca no período de 1995 a 2000, das quais 82 (3,2%) foram resistentes ao ácido nalidíxico. Esses dados mostraram que a resistência às quinolonas aumentou de 0,8%, em 1995, para 8,5%, em 2000, naquele país.

Resultados diferentes foram encontrados por Oliveira et al. (2005) que estudaram 91 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, carcaças de frango, amostras relacionadas a aves e alimentos envolvidos em surtos de Salmoneloses, no Estado do RS e demais localidades, no período de 1995 a 1997. Nenhuma amostra isolada de humanos e de alimentos apresentou resistência a gentamicina ou estreptomicina e somente 3,2% das 31 amostras isoladas de alimentos envolvidos em surtos foram resistentes ao ácido nalidíxico. Comparando somente os resultados obtidos a partir das amostras relacionadas aos alimentos com os resultados obtidos no nosso estudo, pode-se sugerir um aumento na resistência a gentamicina, estreptomicina e ácido nalidíxico entre as *S. Enteritidis* relacionadas com os surtos de Salmonelose ocorridos no RS.

Confrontando com nossos resultados, Cruchaga et al. (2001) encontraram maiores taxas de resistência ao ácido nalidíxico (31%) e menores taxas de resistência a gentamicina (1%) e estreptomicina (1%) em *S. Enteritidis* isoladas de humanos, na Espanha, em 1998. Esses pesquisadores observaram que *S. Enteritidis* foi o sorovar mais freqüente entre isolados de espécimes clínicos de humanos (n=385), sendo que 60% apresentaram resistência a alguma droga, principalmente a ampicilina (23%), sulfonamidas (20%) ou ácido nalidíxico (31%).

Menores porcentagens de resistência a gentamicina (0 e 1%) e ao ácido nalidíxico (2% e 4%) também foram encontradas por Breuil et al. (2000) em amostras de *S. Enteritidis* isoladas de humanos e animais, analisadas na França, nos anos de 1994 e 1997.

Tassios et al. (1997) analisaram 350 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de humanos com gastroenterite ou septicemia, de rações e de alimentos, durante um período de sete anos, na Grécia. Esses autores observaram que a resistência a gentamicina permaneceu muito baixa (máximo de 4%), enquanto que a resistência à estreptomicina apresentou um aumento expressivo, passando de 6%, em 1987, para 24%, em 1993, nos isolados de humanos. De acordo com os mesmos autores, a resistência a ampicilina substituiu a resistência a doxiciclina, tornando-se a principal resistência desde 1991 e aumentando de 10% em 1987 para 52% do total de isolados. Outros pesquisadores também encontraram níveis expressivos de resistência a ampicilina entre *S. Enteritidis* isoladas de humanos, animais e alimentos (BREUIL et al., 2000; CRUCHAGA et al., 2001). Entretanto, nossos resultados apontaram somente 2,5% das amostras de *S. Enteritidis* resistentes a essa droga. A baixa resistência de *S. Enteritidis* à ampicilina é importante, uma vez que esse antimicrobiano é administrado com frequência no tratamento de infecções sistêmicas por *Salmonella* (OLIVEIRA et al., 2005).

No presente estudo, um aumento na resistência intermediária à neomicina, à canamicina, à gentamicina e à estreptomicina foi verificado nas linhagens de *S. Enteritidis* isoladas em 2001 para as isoladas em 2002. Além disso, na Tabela 2, pode-se observar que taxas expressivas de resistência intermediária foram encontradas para canamicina (29,1%), neomicina (17,7%) e estreptomicina (13,9%), indicando um provável aumento da resistência a esses antimicrobianos futuramente.

A alta susceptibilidade à tetraciclina em linhagens de *S. Enteritidis* não era um resultado previsível, uma vez que este antimicrobiano é amplamente utilizado na produção de frangos (OLIVEIRA et al. 2005) e grande parte das linhagens de *S. Enteritidis* estudadas no presente trabalho foram isoladas de alimentos contendo ovos e carne de frango (APÊNDICE A).

Os isolados de *S. Enteritidis* analisados nesse estudo demonstraram altas porcentagens de sensibilidade e baixa incidência de resistência múltipla. Apenas 16,5% dos isolados analisados demonstraram ser resistentes a mais de um antimicrobiano. Resultados similares têm sido observados por diversos pesquisadores para o sorovar *S. Enteritidis* (THRELFALL, 2002; KIESSLING et al., 2002; WYBO et al., 2002; MAMMINA et al., 2002). Como exemplo disso, Threlfall (2002) constatou que a incidência de resistência múltipla em *S. Enteritidis* isoladas de humanos, na Inglaterra e País de Gales, foi muito baixa no período de 1996 a 2000. Em 1996, entre 18.968 isolados, somente 0,4% apresentou resistência múltipla. Em 1999 e 2000, 0,6% e 2,0% de 10.596 e 8.468 isolados, respectivamente, foram resistentes a mais de um agente antimicrobiano.

Entre 62 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de humanos e aves, no Uruguai, no período de 1995 a 2002, 56 foram susceptíveis aos seis antimicrobianos testados, enquanto os outros seis isolados apresentaram resistência apenas ao ácido nalidíxico (BETANCOR et al., 2004).

Para efeito de comparação, após a análise da resistência a antimicrobianos de mais de 10.000 amostras de *S. Typhimurium*, Threlfall

(2002) observou que 81%, 59 e 67% dos isolados foram multi-resistentes, nos anos de 1996, 1999 e 2000, respectivamente.

Em nosso estudo, 32 perfis de susceptibilidade foram identificados (TABELA 3), sendo que apenas uma linhagem foi resistente a três antimicrobianos e duas outras linhagens foram resistentes a quatro drogas. Na maioria das amostras que apresentaram alguma resistência, esta foi verificada contra apenas um ou dois antimicrobianos. Resultados semelhantes foram apresentados por outros pesquisadores que estudaram a susceptibilidade a antimicrobianos em *S. Enteritidis* (TASSIOS et al., 1997; HERNANDEZ et al. 2002; YANG et al., 2002; FERNANDES et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005).

Entre as 76 amostras de *S. Enteritidis* provenientes de alimentos que causaram surtos de Salmonelose no RS num período anterior a esse estudo (1999 e 2000), foram observados 36 perfis quanto à susceptibilidade a antimicrobianos, sendo que a resistência múltipla foi verificada em 23% dos isolados (GEIMBA et al., 2003).

O uso de antimicrobianos em rações animais como promotores de crescimento é considerado a principal causa do decréscimo da susceptibilidade a antimicrobianos em *Salmonella* (THRELFALL, 2002). Contudo, embora as rações para aves, freqüentemente, contenham antimicrobianos na sua composição, *S. Enteritidis* mantém altos níveis de sensibilidade a diversas drogas em diferentes partes do mundo.

Cabe ressaltar que, mesmo verificando através desse trabalho que a resistência a antimicrobianos das amostras de *S. Enteritidis* envolvidas em Salmoneloses apresenta-se baixa, atenção deve ser dada à existência de

linhagens de *S. Enteritidis* multi-resistentes no RS e em outras partes do Brasil e também para o aumento da incidência deste sorovar em nosso País (TAVECHIO et al., 1999).

5.3 Caracterização Molecular por PCR-ribotipificação e RAPD

Diversas técnicas moleculares vêm sendo aplicadas para caracterizar linhagens de *Salmonella* isoladas de animais, humanos ou alimentos envolvidos em surtos (THONG et al., 1995; MILLEMANN et al., 1996; LANDERAS & MENDOZA, 1998; MILLEMANN et al., 2000; EBNER & MATHEW, 2001; CERRO et al., 2002). Entre os métodos mais utilizados, destacam-se: *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) (LACONCHA et al., 1998; MURESU et al., 2001), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) (MILLEMANN et al., 1996), PCR-ribotipificação (LANDERAS & MENDOZA, 1998) e *Random Amplified Polimorphic DNA* (RAPD) (BETANCOR et al., 2004). Atualmente, acredita-se que para realizar uma adequada discriminação de *Salmonella* sp., mais que um método de tipificação deva ser empregado, uma vez que não há nenhuma técnica molecular que satisfaça totalmente aos critérios de elevado poder discriminatório, facilidade e rapidez de execução e interpretação dos resultados, baixo custo de operação e manutenção. Nesse estudo, foram escolhidas as técnicas moleculares PCR-Ribotipificação e RAPD, por serem de fácil execução, por apresentarem um custo relativamente baixo e por poderem ser executadas em um curto período de tempo.

De modo geral, as análises de PCR-ribotipificação e RAPD demonstraram boa reprodutibilidade em diferentes ensaios após a cuidadosa otimização dos fatores que poderiam influenciar na reprodutibilidade, ou seja, concentrações de DNA molde, de seqüências iniciadoras e de cloreto de magnésio, número de ciclos e temperatura de anelamento.

Para alguns autores (POWER, 1996; LACONCHA et al., 1998; MEUNIER & GRIMONT, 1993) a variabilidade entre termocicladores seria o principal fator limitante para a reprodutibilidade da técnica de RAPD, o que dificultaria comparações intra-laboratoriais. Isto porque a ação das trocas de temperatura sob a amostra de DNA seria influenciada pelo tipo de termociclador e pela espessura dos diferentes tubos de reação empregados. Nos nossos experimentos, a variação tanto dos tubos de reação quanto dos termocicladores não ocasionou variabilidade no perfil de bandas obtido.

Alguns pesquisadores verificaram que quando oligonucleotídeos apropriados são identificados e empregados, a RAPD representa um método de tipificação simples e rápido (LIN et al., 1996; MURESU et al., 2001) que pode apresentar um poder discriminatório semelhante ao PFGE para linhagens de *S. Enteritidis* (HUDSON et al., 2001; MURESU et al., 2001), fornecendo informações importantes em estudos epidemiológicos desse microrganismo (VAN LITH & AARTS, 1994; FADL et al., 1995; LIN et al., 1996; LÓPEZ-MOLINA et al., 1998).

No presente trabalho, a PCR-ribotipificação e a RAPD identificaram dois e quatro perfis de bandas para as 79 amostras de *S. Enteritidis*, respectivamente. As bandas apresentaram tamanhos entre 300 a 800pb na

PCR-ribotipificação e entre 400 a 850pb na RAPD. Essas técnicas produziram perfis de bandas distintos para os diferentes sorovares de *Salmonella* testados (*S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Infantis*, *S. Javiana* e *S. enterica subsp. enterica*, 1,4,5).

Os perfis obtidos por PCR-ribotipificação foram os mesmos observados para as *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos, no período de 1999 a 2000 (GEIMBA et al., 2003), sugerindo linhagens semelhantes continuam causando a maioria dos surtos no RS.

Diversos autores têm utilizado a PCR-ribotipificação e a RAPD para a caracterização de *Salmonella*, obtendo resultados similares aos encontrados em nosso trabalho (KOSTMAN et al., 1992; BAUDART et al., 2000; SOTO et al., 1999, SOTO et., 2000, SOTO et, 2001). Lagatola et al. (1996) utilizaram a PCR-ribotipificação para analisar 218 isolados de diversos sorovares de *Salmonella* isolados em um hospital italiano, no período de 1977 a 1994. Entre os 41 isolados de *S. Enteritidis* foi identificado um único perfil composto por quatro bandas entre 700 e 1100pb, o qual era diferente dos perfis obtidos para outros sorovares. Landeras & Mendoza (1998) estudaram 65 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de espécimes clínicos de humanos, em diferentes regiões da Espanha, e encontraram um único perfil de PCR-ribotipificação, composto por somente três fragmentos entre 700 e 1000pb. Na Itália, Nastasi & Mammina (1996) aplicaram a PCR-ribotipificação na caracterização de 405 amostras de *S. Enteritidis* relacionadas e não relacionadas a surtos de Salmonelose, no período de janeiro de 1980 a junho de 1994. Esses autores observaram 15 perfis e consideraram a PCR-ribotificação como uma técnica

adequada e reprodutível para avaliar a relação genética de linhagens de *S. Enteritidis*.

Em um outro estudo, Cerro et al. (2002) encontraram três perfis de PCR-ribotipificação entre 46 amostras de *Salmonella* pertencentes a 13 sorovares diferentes, isoladas de amostras de origem animal. O número de bandas variou de dois a três, na faixa de 700 a 1000pb. Quando as mesmas amostras foram submetidas à RAPD, 11 perfis foram observados. Em relação às seis amostras de *S. Enteritidis* analisadas, dois perfis foram encontrados tanto para PCR-ribotipificação quanto para RAPD. Os autores ressaltaram a facilidade de realização das análises empregando a PCR.

Betancor et al. (2004) utilizaram cinco seqüências iniciadoras para caracterizar 62 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos relacionados com surtos ocorridos no Uruguai no período de 1995 a 2002. A maioria (77%) dos isolados apresentou um único perfil de RAPD. Laconcha et al. (1998) encontraram cinco perfis produzidos por RAPD entre 39 isolados de *S. Enteritidis* relacionadas e não relacionadas com gastroenterites alimentares, sendo que 75% das amostras foram agrupadas em um mesmo perfil.

Ling et al. (1998) analisaram 275 amostras de *S. Enteritidis* isoladas entre 1986 e 1996 em Hong Kong sendo que 90% dos isolados apresentou um perfil idêntico ou similar, através das análises por ribotipificação e por RAPD, sugerindo que uma linhagem predominante de *S. Enteritidis* estaria circulando em Hong Kong, durante o período em estudo.

Observando esses resultados obtidos em diferentes países, pode-se sugerir que *S. Enteritidis* apresenta pouca diversidade genética (LIEBISCH &

SCHWARTZ, 1996; LING et al., 1998; MARÉ et al., 2001; CERRO et al., 2002; BETANCOR et al., 2004), uma vez que a maioria dos isolados analisados pôde ser agrupada em um ou poucos perfis. Esses resultados têm sido confirmados por outros pesquisadores que utilizaram diferentes técnicas moleculares, como o PFGE (LACONCHA et al., 1998, MURESU et al., 2001) e rep-PCR (OLIVEIRA et al., 2005).

De acordo com nossos resultados, a maioria dos isolados foi agrupada em um mesmo perfil de PCR-ribotipificação e RAPD, o que justifica os baixos índices de discriminação encontrados, 0,14 e 0,33, respectivamente. Resultados semelhantes foram obtidos por Landeras et al. (1998). A pouca variabilidade dos perfis obtidos através das duas técnicas sugere que estas não foram capazes de discriminar os isolados de *S. Enteritidis* de diferentes origens ou que uma única linhagem de *S. Enteritidis* tem sido isolada de alimentos envolvidos em Salmoneloses ocorridas em diferentes municípios do RS, no período de 2001 a 2002. Outros estudos também verificaram que isolados de *S. Enteritidis* têm demonstrado ser bastante relacionados, mesmo quando oriundos de regiões geograficamente distantes (THONG et al., 1995), de surtos não relacionados (USERA et al., 1994) ou em diferentes períodos de tempo (TASSIOS et al., 1997). A comparação da linhagem de *S. Enteritidis* prevalente no RS com amostras coletadas em outros Estados do Brasil, e posteriormente, em outros países, poderá esclarecer se essa linhagem é específica desse Estado ou pode ser encontrada em outras regiões. Os fatores responsáveis pela aparente emergência de uma linhagem de *S. Enteritidis* predominante ainda não são conhecidos.

Apesar dos métodos de caracterização molecular serem considerados mais sensíveis e com maior poder de discriminação que os métodos fenotípicos, a caracterização fenotípica por susceptibilidade a antimicrobianos permitiu diferenciar um maior número de perfis entre as *S. Enteritidis* analisadas. Esse fato demonstra a necessidade da utilização de métodos fenotípicos, juntamente com métodos genotípicos, na caracterização de *S. Enteritidis* e também sugere que a variabilidade fenotípica desse microrganismo é mais susceptível a pressões seletivas que a variabilidade genotípica das regiões espaçadoras hipervariáveis entre os genes 16S e 23S analisadas.

6. CONCLUSÕES

- *S. Enteritidis* foi o sorovar isolado com maior frequência em alimentos envolvidos em surtos de Salmonelose no RS, no período de 2001 a 2002.
- Grande parte dos isolados de *S. Enteritidis* estudados foi sensível a todos os antimicrobianos testados.
- A maioria dos isolados de *S. Enteritidis* foi agrupada em um único perfil de PCR-Ribotipificação e de RAPD, sugerindo que essas técnicas não foram eficientes na discriminação dos isolados ou que uma mesma linhagem está presente em diferentes localidades do RS.
- A caracterização fenotípica por susceptibilidade a antimicrobianos permitiu diferenciar um maior número de perfis entre as *S. Enteritidis* analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AABO, S.; BROWN, D.; OLSEN, J. E. Virulence characterization of a strain of *Salmonella enterica* subspecies *houten* (subspecies IV) with chromosomal integrated *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) genes. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p.183-189, 2000.

AGRON, P.G. et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, p.4984-4991, 2001.

ANGULO, F.J.; SWERDLOW. Epidemiology of human *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infections in the United States. In: SAEED, A. M. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in human and animals: epidemiology, pathogenesis, and control**. Ames: Iowa State University Press, 1999, p. 33-41.

AMY, M et al. Identification of a new *Salmonella enterica* serovar Enteritidis locus involved in cell invasion and in the colonization of chicks. **Research in Microbiology**, Paris, v.155, p.543-552, 2004.

ANDREWS, W. H. et al. *Salmonella*, p. 51-69. In: AOAC. **Bacteriological Analytical Manual**. 7th ed. Arlington, 1992.

ARAÚJO, E. et al. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis, associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.9, p.24-26, 1995.

BAAY, M.F.; IN'T VELT, J.H.J. Alternative antigens reduce cross-reactions in an ELISA for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.74, p.243-247, 2000.

BANWART, G. J. **Basic Food Microbiology**. 2ed. New York: Van Nostrand Reinhold, 1989. 781p.

BARROW, P. A. Virulence of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In: SAEED, A.M. ***Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis, and control**. Ames: Iowa State University Press, 1999. p. 173-181.

BAUDART, J et al. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.66, p.1544 -1552, 2000.

BÄUMLER, A. J., et al. Evolution of host adaption in *Salmonella enterica*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 66, p. 4579-4587, 1998.

BÄUMLER, A.J.; HARGIS, B.M.; TSOLIS, R.M.. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. **Science**, Washington, v.287, p.50-52, 2000.

BENNISH, M.L.; LEVY S.B. **Antimicrobial resistance of enteric pathogens: Infections of the gastrointestinal tract**. New York: Raven Press, 1995.1523p.

BETANCOR, L. et al. 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 Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, p.1155-1162, 2004.

BEYER, W. et al. Suitability of repetitive- DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p.1549-1554, 1998.

BLASER, M. J.; NEWMAN, L.S. A review of human salmonellosis. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v.4, p.1096-1106, 1982.

BOUVET, P. J. M. et al. Human salmonellosis surveillance in France: recent data from the National Reference Center. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SALMONELLA & SALMONELLOSIS, 2002, St. Brieue: AFSSA/INRA: InVS: Institut Pasteur: ISPAIA, 2002, p. 411-416.

BRASIL. Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial** [da República Federativa do Brasil], Brasília, 02 de jan. 2001.Seção 1.

BREUIL, J. et al. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.46, p.965-971, 2000.

BURR, M. D.; JOSEPHSON, K. L.; PEPPER, I.L. An evaluation of DNA-based methodologies for subtyping *Salmonella*. **Critical reviews in Environmental Science and Technology**, Boca Raton, v.28, n.3, p.283-323, 1998.

CAMARGO, N. J. et al. Avaliação epidemiológica de doenças transmitidas por alimentos no Estado do Paraná entre 1978 e 1997. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5, 1998, Curitiba, **Anais...**Curitiba. 1998a. p.67-67.

CAMARGO, N.J.; SOUZA, I.L.; PUZYNA, I.P.; PESTANA, A. **Surtos de 1978 a 1997**. Curitiba: Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária, 1998.

CAMARGO, N.J.; SOUZA, I.L.; PUZYNA, I.P.; PESTANA, A. Surtos doenças transmitidas por Alimentos em 1998. Curitiba: **Secretaria de Saúde do Estado do Paraná, Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária**, 1999.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION. FoodNet – 1999 Surveillance Results – Preliminary Report. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA. Disponível em: www.cdc.gov/ncidod/dbmd/foodnet. 2000. Acesso em: 20/11/2004.

CERRO, A. et al. PCR-based procedures in detection and DNA-fingereprinting os *Salmonella* from samples of animal origin. **Food Microbiology**, London, v.19, p.567-575, 2002.

CHALKER, R.B.; BLASER, M.J. A review of human salmonellosis. III.Magnitude of *Salmonella* infection in United States. **Reviews of Infectious Diseases**, Chicago, v. 10, p.111-124, 1988.

CHUNG, K. C.; GOEPFERT, J. M. Growth of *Salmonella* at low pH. **Journal of Food Science**, Chicago, v.35, p.326-328, 1970.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.33, p.1-5, 2002.

CRUCHAGA, S et al. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 47, p.315-321, 2001.

D'AOUST, J.Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.12, p.17-40, 1991.

D'AOUST, J. Y. et al. Antibiotic resistance of agricultural and foodborne *Salmonella* isolates in Canada: 1986-1989. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.55, p.428-434, 1992.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucous. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, p.405-428, 1999.

DOYLE, M. P.; CLIVER, D.O. **Salmonella**. Foodborne Disease. London: Academy Press, 1990. p. 185-204.

EBNER, P.D.; MATHEW, A.G. Three molecular methods to identify *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104: PCR fingerprinting, multiplex PCR and rapid PFGE. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 205, p.25-29, 2001.

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

FANTASIA, M.; FILETICI, E. *Salmonella* Enteritidis in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.7-13, 1994.

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**, São Paulo, v. 45, p. 59-63, 2003.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Bacteriological Analytical Manual**. 7th Ed. Airlington: AOAC International, 1992.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

GALÁN, J. E.; GINOCCHIO, C. C.; COSTEAS, P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *invA* members of a new protein family. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.174, p.4338-4349, 1992.

GEIMBA, M.P. et al. Characterization by antimicrobial resistance, plasmid profile, PCR-ribotyping and PFGE of *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in south of Brazil, 1999-2000. In:

ASM Conferenes. **Salmonella**: Pathogenesis, Epidemiology, and Vaccine Development. American Society for Microbiology: Alghero (Sardinia), Itália, 2003. p. 58-59.

GEIMBA, M.P. et al. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* sp. isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, South of Brazil. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 67, p. 1229-1233, 2004.

GERNER-SMIDT, P.; WEGENER, H.C. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Denmark. In: SAEED, A.M. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals**: epidemiology, pathogenesis, and control. 1ed. Ames: low State University Press, 1999. p.63-69.

GIBSON, A. M.; BRATCHELL, N.; ROBERTS, T. A. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.6, p.155-178, 1988.

GINOCCHIO, C. C. et al. Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. **Cell**, Cambridge, v.76, p.717-724, 1994.

GLÓSNICKA, R.; KUNIKOWSKA, D. The epidemiological situation of *Salmonella enteritidis* in Poland. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.21, p.19-30, 1994.

GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; MENDOZA, M.C. Polimorphism of rRNA genes and plasmid analysis in the typing of *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis from a Spanish health area. **Microbiologica**, Madri, v.18, p.377-384, 1995.

GRIMONT, P.A.D. et al. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in France: epidemiology, prevention, and control. In: SAEED, A.M. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals**: epidemiology, pathogenesis, and control. Ames: low State University Press, 1999, p.43-49.

GULIG, P. A et al. Molecular análisis of *spv* virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. **Molecular Microbiology**, Salem, v.7, p.825-830, 1993.

GUSTAFON, R. H; BOWEN, R. E. Antibiotic use in animal agriculture. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.83, p.531-541, 1997.

HENSEL, M. et al. Functional analysis of *ssaJ* and *ssaK/U* operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. **Molecular Microbiology**, Salem, v.24, p.155-167, 1997.

HERIKSTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.129, p.1-8, 2002.

HERNANDEZ, T. et al. Antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from chickens in Spain. **The Journal of Chemotherapy**, London, v.14, p.346-350, 2002.

HILTON, A. C.; BANKS, J. G.; PENN, C. W. Optimization of RAPD for fingerprinting *Salmonella*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.24, p. 243-248, 1997.

HOSEIN, I. K.; DUERDEN, B. I. Introducing rapid methods in the diagnostic laboratory. **Reviews in Medical Microbiology**, Glasgow, v.5, p.39-46, 1994.

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**, Kenett Square, v.48, p.875-886, 2001.

HUNTER, R. R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.28, p.1903-1905, 1990.

HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.26, p.2465-2466, 1988.

ICMSF- International Commission Microbiological Specification for foods. **Ecologia Microbiana de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980, v.2.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 5th Ed. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 679p.

JENSEN, M. A.; WEBSTER, J. A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.59, p.945-952, 1993

JENSEN, M.A.; HUBNER, R.J.. Use of Homoduplex Ribosomal DNA Spacer Amplification Products and Heteroduplex Cross-Hybridization Products in the

Identification of *Salmonella* Serovars. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2741-2746, 1996.

JOHNSON, J.R. et al. Molecular analysis of a hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p. 3452–3460, 2001.

KAKU, M. et al. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, n.2, p.127-131, 1995.

KANTAMA, L.; JAYANETRA, P. *Salmonella* Enteritidis outbreak in Thailand: study by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v.27, p. 119-125, 1996.

KAUFFMAN, F. Kauffmann-White Schema. In: SEROLOGICAL diagnosis of *Salmonella* species. Copenhagen: Munksgaard, p.59-123, 1972.

KIESSLING, C.R. et al. Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates, 1999-2000. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, p.603-608, 2002.

KILGER, G.; GRIMONT, P.A. D. Differentiation of *Salmonella* phase 1 flagellar antigen types by restriction of the amplified *fliC* gene. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.31, p. 1108- 1110, 1993.

KONEMAN, E.K. et al. **Diagnostic Microbiology**. 5 Ed. Lippincott, New York, 1997. 139p.

KOSTMAN, J.R et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.30, p.2084-2087, 1992.

LACONCHA, I. et al. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.40, p.27-34, 1998.

LACONHA, I. et al. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1,4,6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.75, p.155-165, 2000.

LAGATOLLA, C. et al. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.2440-2443, 1996.

LANDERAS, E. et al. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis: Relationships between food, water and pathogenic strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.43, p.81-90, 1998.

LANDERAS, E.; MENDOZA, M.C. Evaluation of PCR-based methods and ribotyping performed with a mixture of *Pst*I and *Sph*I to differentiate strains of *Salmonella* serotype Enteritidis. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 47, p.427-434, 1998.

LIEBANA, E. et al. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from english poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.39, p.154-161, 2001.

LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. **Journal of Medical Microbiology**, London, v. 44, p. 52-59, 1996.

LIN, A.W. et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.34, p.870-876, 1996.

LING, J.M. et al. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.36, p.1693-1699, 1998.

LING, M. L.; WANG, G. C. Y. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates in Singapore. **The Journal of Infection**, London, v.43, p.169-172, 2001.

LOPALCO, P. L. et al. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic: **Annali D'Igiene Sperimentale**, Roma, v.12, p.279-285, 2000.

LÓPEZ-MOLINA, N et al. Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types by PCR fingerprinting. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.84, p. 877-882, 1998.

LUZ, S. P. et al. Variation of the operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.180, p.2144-2151, 1998.

MAMMINA, C. et al. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolates from sewage plant effluents in Sicily. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SALMONELLA & SALMONELLOSIS, 2002, St. Brieue: AFSSA:INRA: InVS: Institut Pasteur: ISPAIA. 2002, p. 515-516.

MARÉ, L.; DICKS, L.M.T.; VAN DER WALT, M.L. Characterization of South African isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 64, p.237-245, 2001.

MCDONALD, K. L. et al. Changes in antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from humans in the United States. **Journal Of The American Medical Association**, Chicago, v.258, p.1496-1499, 1987.

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 animals: epidemiology, pathogenesis, and control**. Ames: Iowa State University Press, 1999.125-140.

MEUNIER, J. R.; GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Research in Microbiology**, Paris, v.144, p.373-379, 1993.

MILLEMANN, Y. et al. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, p.173-179, 1995.

MILLEMANN, Y. et al. Comparison of random polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v.14, p.129-134, 1996.

MILLEMANN, Y. et al. Evaluation of IS200-PCR and comparison with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. Enterica serotype Typhimurium bovine isolates from farm to meat. **Journal Clinical Microbiology**, Washington , v.38, p.2204-2209, 2000.

MOLBAK, K. et al. Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.8, p.514-515, 2002.

MURAKAMI, K.; HORIKAWA, K.; OTSUKI, K. Genotypic characterization of human and environmental isolates of *Salmonella choleraesuis* subspecies *choleraesuis* serovar Infantis by pulsed-field gel electrophoresis. **Microbiology and Immunology**, Tóquio, v.43, p.293-296, 1999.

MURESU, E. et al. Clonal relations among *Salmonella* Enteritidis phage type 3 outbreak isolates traced by DNA fingerprinting. **Microbiologica**, Madri, v.24, p. 371-377, 2001.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2000. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 11th informational supplement. Approved standard M2-A7 and M7-A5., Wayne, PA, USA, 2000.

NASTASI, A.; MAMMINA, C. Epidemiological evaluation by PCR ribotyping of sporadic and outbreak associated strains of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Research in Microbiology**, Paris, v.146, p.99-106, 1995.

NASTASI, A.; MAMMINA, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in southern Italy during the years 1980-1994. **Research in Microbiology**, Paris, v.147, p.393-403, 1996.

NYLEN, G.; FIELDER, H. M. P.; PALMER, S. R. An international outbreak of *Salmonella enteritidis* associated with lasagna: lessons on the need for cross-national co-operation in investigating foodborne outbreaks. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.123, p.31-35, 1999.

OGUNNIYI, A.D.; KOTLARSKI, I.; MORONA, R. Role SefA subunit protein of SEF14 fimbriae in the pathogenesis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Infection and Immunity**, Washington, v.65, p.708-717, 1997.

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.** p.141. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 2004.

OLIVEIRA, S.D.; FLORES, F.S.; SANTOS, L.R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples: **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.97, p.297-305, 2005.

OLSEN, J.E. et al. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. **Veterinary Quarterly**, The Hague, v.15, p.125-135, 1993.

PARRA, F.E. Exclusión Competitiva em Salmonelosis: Revision. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE PATOLOGIA AVIÁRIA: Associação Colombiana de Médicos Veterinários y Zootecnistas Especialistas em Avicultura y University of Geórgia. 1994, Athens. **Anais**. Athens, 1994. 703p.

PERESI, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causadas por *Salmonella* Enteritidis: **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.32, p.1-13, 1998.

PIERSON, M. An overview of HACCP and its application to animal production food safety. In: NATIONAL SYMPOSIUM AND ANUAL CONFERENCE OF RESEARCH WORKERS IN ANIMAL DISEASES, 1995, Chicago. **Anais...** Chicago: 1995. p.192-198.

POPOFF, M.; LE MINOR. Antigenic formulas of *Salmonella* serovars. In: NATIONAL *Salmonella* Center by the WHO. Collaborating Centre of Research on *Salmonella*, Paris: Institute Pasteur, 1997.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 (nº.45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v.154, n3, p.173-174, 2003.

POPPE, C.; McFADDEN, K. A.; DEMCZUK, W. Drug resistance plasmids, biotypes and susceptibility to bacteriophages of *Salmonella* isolated from poultry in Canada. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.30, p.325-344, 1996.

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

POWER, E.G.M. RAPD typing in microbiology – a technical review. **The Journal of Hospital Infection**, London, v.34, p.247-265, 1996.

REXACH, L.; DILASSER, F.; FACH, P. Polymerase chain reaction for *Salmonella* virulence-associated plasmid genes detection: a new tool in *Salmonella* epidemiology. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.112, p.33-43, 1994.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. Divisão de Vigilância Sanitária. **Relatórios Anuais de DTA**. Porto Alegre, 2001 (não paginada).

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

SAMBROOK, J. et al. **Molecular Cloning**: a laboratory manual. 2ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989. 3v.

SANTOS, S. M.; KUPEK, E. Serial outbreaks of food-borne disease in Blumenau, Brazil, caused by *Salmonella* Enteritidis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 4, p.275-278, 2000.

SCHMID, H.; BAUMGARTNER, A. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Switzerland: recognition, development, and control of the epidemic. In: SAEED, A.M. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis, and control**. Ames: Iowa State University Press, 1999, p.81-89

SHERIDAN, J. J.; MCDOWELL, D. A. Factors affecting the emergence of pathogens on foods. **Meat Science**, Barking, v.49, p.151- 167, 1998.

SIMONSEN, B. et al. Prevention and control of foodborne salmonellosis through application of Hazard Analysis Critical Control Point. (HACCP). **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam v.4, n.3, p.227-47, 1987.

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, 1997, Rio de Janeiro. **Resumos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1997. p. 126.

SOTO, S.M. et al. Potencial of three way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.65, p.4830-4836, 1999.

SOTO, S.M. et al. Usefulness of genetic typing methods to trace epidemiologically *Salmonella* serotypes in Ohio. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.125, p.481-489, 2000.

SOTO, S.M. et al. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v.71, p.35-43, 2001.

SOUZA, A. P. M. et al. Contaminação de alimentos por *Salmonella* spp. no município do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.13, n.61, p.22, 1999.

TASSIOS, P.T. et al. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7-years period in Greece. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.35, p.1316-1321, 1997.

TAORMINA, P. J.; BEUCHAT, L. R.; SLUTSKER, L. Infections associated with eating seed sprouts: an international concern. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.5, p.626-634, 1999.

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**, São Paulo, v.38, p.315-322, 1996.

TAVECHIO AT et al. Resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* isolados no estado de São Paulo no período de 1996 a 1999. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 1999, **Resumos...** Salvador, Brasil: 1999. p.86.

THIEL, W. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage types in Áustria: from understanding to intervention. In: SAEED, A.M. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis, and control**. Ames: Iowa State University Press, 1999. p.91-109.

THONG, K.L. et al. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* pulsed field gel electrophoresis and ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, p.1070-1074, 1995.

THRELFALL, E. J.; FROST, J. A. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.68, p.5-16, 1990.

THRELFALL, E.J.; HALL, M. L. M.; ROWE, B. *Salmonella*: bacteraemia in England and Wales, 1981-1990. **Journal of Clinical Pathology**, London, v.45, p.34-36, 1992.

THRELFALL, E.J. et al. Use of plasmid profile typing for surveillance of *Salmonella enteritidis* phage type 4 from humans, poultry and eggs. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.112, p.25-31, 1994.

THRELFALL, E.J. et al. Increase in multiple resistance in nontyphoidal *Salmonella* from humans in England and Wales: A comparison of data for 1994 and 1996. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v.3, p.263-266, 1997.

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

TONDO, E. C.; PAULA, C. M. D.; MARIOT, R. F.. Thermal inactivation of *Salmonella* Enteritidis by boiling and frying egg methods. **Journal of Food Safety**, Westport, v.25, p.43-57, 2005.

TSCHÄPE, H. et al. Ups and downs of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Germany. In: SAEED, A.M. **Salmonella enterica serovar Enteritidis in humans and animals: epidemiology, pathogenesis, and control**. Ames: Iowa State University Press, 1999, p.51-61.

TSEN, H. Y.; J. S. LIN. Analysis of *Salmonella enteritidis* strains isolated from food-poisoning cases in Taiwan by pulsed field gel electrophoresis, plasmid profile and phage typing. **Journal Applied Microbiology**, Oxford, v.91, p.72–79, 2001.

TSUJI H. et al. Outbreak of *Salmonella enteritidis* caused by contaminated buns peddled by a producer using traveling cars in Hyogo and neighboring prefectures in 1999: an epidemiological study using pulsed-field gel electrophoresis. **Japan Journal Infection Disease**; Tóquio, v. 53, p. 23–24, 2000.

USERA, M.A. et al. Molecular subtyping of *Salmonella enteritidis* phage type 8 strains from United States. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.32, p.194-198, 1994.

USERA, M.A. et al. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v.65, p.768–773, 2002.

VALENCIANO, M. et al. Investigation of concurrent outbreaks of gastroenteritis and typhoid fever following a party on a floating restaurant, France, March, 1998. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, n.152, v.10, p.934-939, 2000.

VAN LITH, L. A.; AARTS, H. J. Polymerase chain reaction identification of *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v.19, p.273–276, 1994.

VILLA, M.F.G. Programa nacional de Sanidade Avícola: 1994 a 1998. In: CONFERÊNCIA APINCO, 1998, Campinas. **Anais**. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 1998. p. 33-45.

WOODWARD M.J. et al. Distribution of virulence plasmids within *Salmonellae*. **Journal of General Microbiology**, London, v.135, p.503-511, 1989.

WYBO, C. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* from humans in Belgium: the situation in 2000 and 2001. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM

SALMONELLA & *SALMONELLOSIS*, 2002, St. Brieue, França: AFSSA:INRA:InVS:Institut Pasteur:ISPAIA, 2002. p. 497-498.

YAN, S. S. et al. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, Chicago, v.4, p.189-204, 2003.

YANG, S.J. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.86, p.295-301, 2002.

APÉNDICE A

APÊNDICE A - . Características das amostras de *Salmonella* sp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Rio Grande do Sul, no período de 2001 a 2002.

N° de registro	Alimento Envolvido	Município de Origem	Data de Análise	Sorovar	Perfil Antibiograma	Perfil PCR-ribotipificação	Perfil RAPD
2387	Maionese	Palmitinho	02/01/01	S. Enteritidis	14	R2	A
2388	Molho	Palmitinho	02/01/01	S. Enteritidis	14	R2	A
022	Maionese	Coronel Bicaco	09/01/01	S. Enteritidis	1	R1	A
150	Maionese	Ametista do Sul	24/01/01	S. Enteritidis	2	R1	A
699	Molho	Caxias do Sul	20/03/01	S. Enteritidis	3	R1	A
701	Maionese	Caxias do Sul	20/03/01	S. Enteritidis	4	R1	A
720	Capeletti cru	Caxias do Sul	20/03/01	S. Enteritidis	5	R2	B
728	Salame	Caxias do Sul	20/03/01	S. Infantis	-	-	-
729	Salame	Caxias do Sul	20/03/01	S. Javiana	-	-	-
983	Carne assada	Porto Alegre	11/04/01	S. Enteritidis	6	R1	A
1054	Torta doce	Caxias do Sul	23/04/01	S. Enteritidis	7	R1	A
1055	Torta doce	Caxias do Sul	23/04/01	S. Enteritidis	8	R1	A

N° de registro	Alimento Envolvido	Município de Origem	Data de Análise	Sorovar	Perfil Antibiograma	Perfil PCR-ribotipificação	Perfil RAPD
1085	Queijo	Taquaruçu do Sul	23/04/01	S. Enteritidis	14	R1	A
1086	Polenta	Taquaruçu do Sul	23/04/01	S. Enteritidis	14	R1	A
1209	Maionese	Taquaruçu do Sul	02/05/01	S. Enteritidis	9	R1	A
1211	Carne de porco	Taquaruçu do Sul	02/05/01	S. Enteritidis	9	R1	A
1709	Torta	Erechim	06/06/01	S. Enteritidis	14	R1	A
3359	Salada de batata com maionese	Três de Maio	18/09/01	S. Enteritidis	15	R1	A
3436	Salsichão cru	Getúlio Vargas	25/09/01	S. Enteritidis	16	R1	B
3447	Carne assada	Harmonia	25/09/01	S. Enteritidis	2	R1	A
3695	Feijão preto	Porto Alegre	04/10/01	S. Enteritidis	13	R1	A
3696	Carne de frango	Porto Alegre	04/10/01	S. Enteritidis	13	R1	A
3697	Molho de tomate	Porto Alegre	04/10/01	S. Enteritidis	13	R1	A
3698	Beterraba	Porto Alegre	04/10/01	S. Enteritidis	2	R1	B

N° de registro	Alimento Envolvido	Município de Origem	Data de Análise	Sorovar	Perfil Antibiograma	Perfil PCR-ribotipificação	Perfil RAPD
3700	Pudim de chocolate	Porto Alegre	04/10/01	S. Enteritidis	12	R1	B
3701	Massa	Porto Alegre	04/10/01	S. Enteritidis	2	R1	A
3834	Salada de batata com maionese	Julio de Castilhos	16/10/01	S. Enteritidis	14	R1	A
3835	Risoto	Julio de Castilhos	16/10/01	S. Enteritidis	14	R1	A
3836	Carne de gado assada	Julio de Castilhos	16/10/01	S. Enteritidis	17	R1	A
3879	Salada de maionese	Santo Cristo	17/10/01	S. Enteritidis	18	R1	A
4051	Queijo ralado	Palmeira das Missões	29/10/01	S. Enteritidis	14	R1	A
4053	Misto quente	Palmeira das Missões	29/10/01	S. Enteritidis	14	R1	A
4148	Maionese	Vitória das Missões	30/10/01	S. Enteritidis	13	R1	C
4479	Bolo recheado	Erechim	20/11/01	S. Enteritidis	2	R1	A
4480	Mousse	Erechim	20/11/01	S. Enteritidis	2	R1	A
4481	Torta de ricota	Erechim	20/11/01	S. Enteritidis	2	R1	A

N° de registro	Alimento Envolvido	Município de Origem	Data de Análise	Sorovar	Perfil Antibiograma	Perfil PCR-ribotipificação	Perfil RAPD
4549	Bolo	Uruguaiana	23/11/01	S. Enteritidis	14	R1	A
4550	Sorvete	Uruguaiana	23/11/01	S. Enteritidis	14	R1	A
4653	Galeto	Caxias do Sul	29/11/01	S. Enteritidis	21	R1	C
4657	Recheio de abóbora	Caxias do Sul	29/11/01	S. Enteritidis	22	R1	A
4842	Salada de batata com maionese	São Martinho	12/12/01	S. Enteritidis	14	R1	A
4909	Carne de gado	Carlos Barbosa	18/12/01	S. Enteritidis	14	R1	B
4979	Molho para cachorro quente	Porto Xavier	18/12/01	S. Enteritidis	24	R1	A
4981	Sagu	Porto Xavier	18/12/01	S. Enteritidis	25	R1	C
510	Salame	Tapejara	01/02/02	<i>S. enterica</i> <i>subsp. enterica</i> 1,4,5	-	-	-
512	Salame	Tapejara	01/02/02	S. Typhimurium	-	-	-
513	Morceia	Tapejara	01/02/02	<i>S. enterica</i> <i>subsp. enterica</i> 1,4,5	-	-	-

N° de registro	Alimento Envolvido	Município de Origem	Data de Análise	Sorovar	Perfil Antibiograma	Perfil PCR-ribotipificação	Perfil RAPD
1399	Ovos “in natura”	Caxias do Sul	12/04/02	S. Enteritidis	14	R1	A
1849	Carne de gado assada	Jacutinga	19/06/02	S. Enteritidis	1	R1	A
2027	Coxinha de frango	Estação	01/07/02	S. Enteritidis	10	R1	A
2028	Pão-de-cachorro quente	Estação	01/07/02	S. Enteritidis	11	R1	A
2035	Pizza de carne	Estação	01/07/02	S. Enteritidis	12	R1	A
2036	Torta recheada	Estação	01/07/02	S. Enteritidis	13	R1	A
3349	Salada de batatas com maionese	Erechim	02/09/02	S. Enteritidis	2	R1	A
3350	Churrasco de carne de gado	Erechim	02/09/02	S. Enteritidis	14	R1	A
3351	Caapeleti cru	Nova Prata	02/09/02	S. Enteritidis	1	R1	A

N° de registro	Alimento Envolvido	Município de Origem	Data de Análise	Sorovar	Perfil Antibiograma	Perfil PCR-ribotipificação	Perfil RAPD
3691	Chá			S.Agona	14	-	-
4019	Prensado	Santo Ângelo	14/10/02	S. Enteritidis	14	R1	A
4055	Churrasco (carne de gado)+galeto	Nova Prata	14/10/02	S. Enteritidis	13	R1	B
4056	Maionese	Nova Prata	14/10/02	S. Enteritidis	19	R1	A
4126	Maionese	Barão do Cotegipe	14/10/02	S. Enteritidis	10	R1	A
4127	Carne de gado cozida	Barão do Cotegipe	14/10/02	S. Enteritidis	2	R1	A
4128	Carne de gado crua	Barão do Cotegipe	14/10/02	S. Enteritidis	20	R1	B
4129	Carne de porco	Barão do Cotegipe	14/10/02	S. Enteritidis	2	R1	D
4264	Bolo recheado	Passo Fundo	14/10/02	S. Enteritidis	14	R1	A
5464	Ovos batidos para maionese	Severiano de Almeida	06/11/02	S. Enteritidis	29	R1	A

N° de registro	Alimento Envolvido	Município de Origem	Data de Análise	Sorovar	Perfil Antibiograma	Perfil PCR-ribotipificação	Perfil RAPD
5465	Salada de maionese	Charqueadas	13/11/02	S. Enteritidis	30	R1	D
5467	Salada de maionese	Bento Gonçalves	20/11/02	S. Enteritidis	14	R1	A
5468	Arroz	Bento Gonçalves	20/11/02	S. Enteritidis	11	R1	A
5469	Carne moída cozida	Bento Gonçalves	20/11/02	S. Enteritidis	12	R1	A
5471	Chico balançado	Bento Gonçalves	20/11/02	S. Enteritidis	13	R1	A
5474	Ovos crus	Erechim	20/11/02	S. Enteritidis	13	R2	A
5475	Salada de maionese	Alegria	21/11/02	S. Enteritidis	31	R2	A
5476	Carne de porco	Alegria	21/11/02	S. Enteritidis	32	R1	D
12	Alface	Alegria	21/11/02	S. Enteritidis	14	R1	A
13	Bolo recheado com amendoim	Caxias do Sul	21/11/02	S. Enteritidis	14	R1	A
15	Salada de maionese	Erechim	25/11/02	S. Enteritidis	14	R1	C

N° de registro	Alimento Envolvido	Município de Origem	Data de Análise	Sorovar	Perfil Antibiograma	Perfil PCR-ribotipificação	Perfil RAPD
5067	Ovos “in natura”	Viadutos	27/11/02	S. Enteritidis	2	R1	A
5068	Maionese	Caxias do Sul	05/12/02	S. Enteritidis	14	R1	A
5069	Churrasco	Caxias do Sul	05/12/02	S. Enteritidis	10	R1	A
5070	Galeto	Caxias do Sul	05/12/02	S. Enteritidis	2	R1	D
5075	Batata cozida	Caxias do Sul	05/12/02	S. Enteritidis	26	R1	A
5099	Maionese caseira	Canoas	05/12/02	S. Enteritidis	27	R1	A
5100	Galinha caipira	Canoas	05/12/02	S. Enteritidis	28	R2	A
5162	Carne de gado	Independência	10/12/02	S. Enteritidis	14	R1	A

NI: dado não informado. Fonte: LACEN/RS

APÉNDICE B

APÊNDICE B - Análises Estatísticas

Determinação Numérica do Índice de Discriminação (D):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{n=1}^s n_j(n_j-1)$$

onde:

s = número total de linhagens diferentes

n_j = número de isolados de cada linhagem

N = número total de isolados dentro da população

Tipificação por Susceptibilidade a antimicrobianos

Perfil	n _j (n _j -1)
1	3 (2) = 6
2	13 (12) = 156
3	1 (0) = 0
4	1 (0) = 0
5	2 (1) = 2
6	1 (0) = 0
7	1 (0) = 0
8	1 (0) = 0
9	2 (1) = 2
10	3 (2) = 6
11	2 (1) = 2
12	3 (2) = 6
13	8 (7) = 56
14	20(21) = 380
15	1 (0) = 0
16	1 (0) = 0
17	1 (0) = 0

18	1 (0) = 0
19	1 (0) = 0
20	1 (0) = 0
21	1 (0) = 0
22	1 (0) = 0
23	1 (0) = 0
24	1 (0) = 0
25	1 (0) = 0
26	1 (0) = 0
27	1 (0) = 0
28	1 (0) = 0
29	1 (0) = 0
30	1 (0) = 0
31	1 (0) = 0
32	1 (0) = 0

$$D = [1 - 1/79 (78)] \times \Sigma\Sigma = 6+156+2+2+6+2+6+56+380 = 616$$

$$D = 1 - 616/6162 = 0,90$$

Tipificação por PCR-Ribotipificação

Perfil	$n_j (n_j - 1)$
R1	73 (72) = 5256
R2	6 (5) = 30

$$D = [1 - 1/79 (78)] \times \Sigma\Sigma = 5256 + 30 = 5286$$

$$D = 1 - 5286/6162 = 0,14$$

Tipificação por RAPD

Perfil	$n_j (n_j - 1)$
A	64 (63) = 4032
B	7 (6) = 42
C	4(3) = 12
D	4(3) = 12

$$D = [1 - 1/79 (78)] \times \Sigma\Sigma = 4032 + 42 + 12 + 12 = 4098$$

$$D = 1 - 4098/6162 = 0,33$$