

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Tese de Doutorado

**CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis ISOLADAS DE ALIMENTOS E DE
HUMANOS POR SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS, PCR-
RIBOTIPIFICAÇÃO E ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO (PFGE)**

Fernanda Arboite de Oliveira

Pelotas, 2009

FERNANDA ARBOITE DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* Enteritidis ISOLADAS DE ALIMENTOS E DE
HUMANOS POR SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS, PCR-
RIBOTIPIFICAÇÃO E ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO (PFGE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências.

Comitê de orientação:
Wladimir Padilha da Silva
Eduardo Cesar Tondo

Pelotas, 2009

Banca examinadora:

.....
WLADIMIR PADILHA DA SILVA (UFPeI)

.....
MARISA CARDOSO (UFRGS)

.....
ELIEZER AVILA GANDRA (UFPeI)

.....
ANA EUCARES VON LAER (UFPeI)

“Às minhas duas Mercedes, por
seus ensinamentos e sua força, seja
num novelo de 86 anos ou numa
meada de 48horas..

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade da trajetória;

À vó Mercedes pelo novelo que não finda...

Aos meus pais João e Erica por fazerem parte desse caminho, sempre me fazendo lembrar que “eu agüento sim!”;

Aos irmãos Daniela, Cléber e Gabriela pelo amor, cada um a sua maneira; em especial (e não podia ser diferente) ao Guilherme pelas idéias, pelo estímulo, pelas visitas e pelos abraços e à Gabriela pela presença e amizade;

Ao sobrinhos do coração Rafa e Duda, pelos risos e por me mostrarem que continua tudo de onde parou, mesmo depois de um período de ausências;

Ao “xodó da dinda”, Kevin Murilo, pelos seus “nascimentos” e seus sorrisos;

Ao meu sogro Ruben pela “carona” até Pelotas e pela torcida;

Às Divas Sabrina e Nina pelas risadas e pela amizade nascida no laboratório;

À dinda Cássia Nespolo pela alegria dos encontros e pela pró-atividade de sempre;

À colega e amiga (não necessariamente nessa ordem) Florencia Cladera pelas dicas e pelo “não te estressa ô coisa triste!” pronunciado e escrito com sotaque espanhol;

À chefe Patrícia Bock (a farmacêutica mais engenheira que conheço) pela confiança no meu trabalho e pela amizade e afinidade;

Aos dindos-afilhados Fabi e Luli pela inigualável e auspiciosa amizade;

Aos amigos Fábio Perini Milara por sua ajuda e incentivo desde o início desse trabalho, sem os quais eu não teria conseguido;

À amiga Paloma por ter me recebido (de braços abertos) e por ter me “guiado” em Pelotas;

À amiga Janaína pelas risadas das terças-feiras e por torcer tanto por mim;

À minha bolsista Ana Paula Pasqualotto pela ajuda na execução dos experimentos;

Aos professores Marisa Cardoso e Cláudio Canal por tornarem possível a tipagem por PFGE;

Ao meu orientador Wladimir pela confiança depositada em mim e no meu trabalho;

Ao amigo e sempre orientador Eduardo Tondo por ter acompanhado meus progressos e meus tropeços nesses mais de 10 anos de convívio, por ter me apresentado o caminho da vida acadêmica e me dado condições para chegar aonde queria;

Ao Felipe Lohmann Arend que me apoiou muito ao longo desse trabalho, inicialmente como amigo e colega de laboratório, depois como namorado e companheiro pras idas ao campus no fim de semana, em seguida como noivo e ótimo ouvinte e nessas últimas etapas como marido e porto seguro durante as longas jornadas de trabalho e estudo.

Resumo

OLIVEIRA, Fernanda Arboite de. **Caracterização de *Salmonella* Enteritidis isoladas de alimentos e de humanos por susceptibilidade a antimicrobianos, PCR-ribotipificação e Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)**. 2009. 115f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Salmonella é um dos principais agentes de doenças de origem alimentar em todo o mundo. No Estado do Rio Grande do Sul, Brasil, esse microrganismo foi identificado como o principal agente causal dos surtos de doenças transmitidas por alimentos nos últimos anos. O Laboratório Central do Estado (LACEN/RS) tem coletado isolados de *Salmonella enterica subsp. enterica* (S.) sorotipo Enteritidis (S. Enteritidis) a partir de alimentos envolvidos nos surtos e de amostras clínicas de indivíduos acometidos por salmonelose, porém, não há estudos comparando as cepas isoladas de alimentos com as isoladas de material clínico humano. Este estudo teve como objetivo caracterizar S. Enteritidis isoladas de alimentos (n = 152), sangue (n = 12) e fezes (n = 68) no período de 1999 a 2006 e investigar a relação clonal entre S. Enteritidis envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul (RS). As cepas foram submetidas ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos e às análises moleculares de PCR-ribotipificação e macrorestrição por *Xba I* e Eletroforese de Campo Pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE). Para confirmar a relação clonal, um fragmento gerado por PCR-ribotipificação foi sequenciado em 26 cepas isoladas de alimentos escolhidas aleatoriamente. Verificou-se que uma cepa específica de S. Enteritidis ou cepas estreitamente relacionadas estiveram envolvidas nos surtos e casos de salmonelose ocorridos no RS no período do estudo. Altas taxas de resistência à ampicilina e ao ácido nalidíxico foram encontradas. S. Enteritidis isoladas de alimentos e de humanos provenientes de diferentes regiões geográficas foram agrupadas em um perfil comum de resistência. Todas as cepas demonstraram perfis semelhantes de PCR-ribotipificação, sendo que o perfil predominante R1 agrupou 47,5% das cepas de origem humana (sangue e fezes) e 94,7% das cepas de alimentos. Um perfil de PFGE (P1) foi prevalente tanto nas cepas isoladas de alimentos (92,8%) quanto entre aquelas isoladas de indivíduos acometidos por salmonelose (96,25%). Os resultados indicam que uma cepa predominante de S. Enteritidis foi responsável pelos surtos de salmonelose no RS, entre os anos de 1999 e 2006.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, PFGE, PCR-ribotipificação, resistência a antibióticos, salmonelose, doenças de origem alimentar

Abstract

OLIVEIRA, Fernanda Arboite de **Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from foods and human samples based on antibiotic susceptibility testing, PCR-ribotyping, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)**. 2009. 115f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas,

Salmonella is one of the principal agents of food-borne diseases transmitted all over the world and in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, this microorganism has been identified as the principal agent of food-borne outbreaks in the last years. Central Laboratory of RS has sampled many isolates of *S. Enteritidis* from foods involved in outbreaks and from human origin, however there is no study comparing food samples with human samples. This study aimed to characterize *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (S.) serovar Enteritidis isolated from food (n=152), blood (n=12) and feces (n=68) and investigate the clonal relationship among *S. Enteritidis* involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul State (RS), Southern Brazil. The isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing, PCR-ribotyping, and XbaI macrorestriction Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). To confirm the clonal relationship, a PCR-ribotyping amplicon was sequenced in 26 randomly chosen *S. Enteritidis* typed. The results indicate that a strain *S. Enteritidis* or a very closely related clone of this microorganism was involved in salmonellosis outbreaks occurred in RS. To confirm the clonal relationship, a PCR-ribotyping amplicon was sequenced in 26 randomly chosen *S. Enteritidis* isolated from foods typed. High rates of ampicillin and nalidixic acid resistance were found. Strains isolated from foods and humans sources collected in different geographic regions of RS clustered together and presents a common resistance profile. All strains demonstrated similar PCR-ribotyping patterns, being that the predominant profile R1 grouped 47.5% of the human strains (blood and feces) and 94.7% of food strains. One PFGE profile (P1) was found in the majority of the food strains (92.8%) and humans strains (96.25%). The results indicate that a specific strain of *S. Enteritidis* was isolated from foods and humans involved in salmonellosis outbreaks occurred in Southern Brazil.

Key-words: *Salmonella* Enteritidis, PFGE, PCR-ribotyping, antimicrobial resistance, salmonellosis, foodborne disease

LISTA DE FIGURAS

- Artigo 1: Figura 1 -** PCR-ribotyping profiles of *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul during the years 1999 to 2002. Lane M: molecular size marker.....62
- Artigo 1: Figura 2 -** Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns for *Xba*I-digested genomic DNA of *Salmonella* Enteritidis strains from foods. Lane numbers correspond to the different patterns. Lane 4 contains a re-typed strain of lane 1. Lane M contains *Xba*I-digested DNA of *Salmonella* Typhimurium LT2.....62
- Artigo 2: Figura 1 -** PCR-ribotyping profiles of *S. Enteritidis* isolated from humans involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul State, South of Brazil, during the years 1999 to 2006. Lane M: molecular size marker (DNA ladder, Invitrogen).77
- Artigo 2: Figura 2 -** Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns for *Xba*I-digested genomic DNA of *Salmonella* Enteritidis strains from humans. Lanes numbers correspond to the different patterns. Lanes 1, 5 and 10 contains *Xba*I-digested DNA of *S. Typhimurium* LT2. Lanes 3,4,6,7,8 and 9, *S. Enteritidis* strains from humans. Lane 2 contain *S. Enteritidis* strains from mayonnaise potato salad.....78

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Antimicrobial resistance, PCR-ribotyping and PFGE profiles of *S. Enteritidis* isolated from human samples involved in salmonellosis outbreaks occurred in Southern Brazil (1999 to 2006).....75

Table 2 - General percentages of antimicrobial resistance among *S. Enteritidis* isolated from human samples involved in foodborne outbreaks occurred in Southern Brazil (1999 to 2006).....76

SUMÁRIO

1. Introdução geral.....	11
2. Projeto de pesquisa.....	15
2.1 Título do Projeto.....	15
2.2 Equipe de Participantes.....	15
2.3 Locais de Execução.....	15
2.4 Introdução e relevância do projeto.....	15
2.5 Objetivo geral	16
2.6 Objetivos específicos.....	17
2.7 Hipótese.....	17
2.8 Fundamentação Científica.....	17
2.8.1 Características gerais do microrganismo.....	17
2.8.2 Características Bioquímicas e Sorológicas.....	18
2.8.3 Classificação Taxonômica.....	18
2.8.4 Características das salmoneloses.....	19
2.8.5 Controle das salmoneloses.....	20
2.8.6 Resistência a antimicrobianos.....	21
2.8.7 Tipificação Molecular.....	22
2.8.8 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)	23
2.8.9 Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)	23
2.9 Materiais e Métodos.....	25
2.9.1 Amostragem.....	25
2.9.2 Isolamento e Identificação.....	25
2.9.3 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos.....	26
2.9.4 Tipificação por RAPD.....	26
2.9.5 Extração de DNA.....	26
2.9.6 Seleção de seqüências iniciadoras.....	26
2.9.7 Reação de PCR.....	26
2.9.8 Tipificação por PFGE.....	27
2.9.10 Análise Estatística.....	28
2.10 Cronograma.....	28
Referências Bibliográficas – Projeto.....	29
3. Revisão Bibliográfica.....	36
3.1 Doenças Transmitidas por Alimentos.....	36
3.2 <i>Salmonella</i> e salmonelose.....	38
3.3 Fatores de virulência e mecanismos de patogenidade de <i>Salmonella</i> sp.....	39
3.4 Adaptação e resistências ácida e térmica em <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	40
3.5 Aderência de <i>Salmonella</i> sp. a superfícies.....	42
3.6 Resistência de <i>Salmonella</i> sp. a sanificantes.....	43
3.7 Técnicas fenotípicas de caracterização de <i>Salmonella</i> sp.....	43
3.7.1 Sorotipificação e importância do sorotipo <i>S. Enteritidis</i> nas salmoneloses.....	43
3.7.2 Fagotipificação.....	46
3.7.3 Susceptibilidade de <i>Salmonella</i> sp. a antimicrobianos.....	47
3.8 Técnicas moleculares de caracterização de <i>Salmonella</i> sp.....	53
4. ARTIGO 1: Clonal relationship among <i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil.....	59
5 ARTIGO 2: Characterization of <i>Salmonella</i> Enteritidis isolated from human samples based on antibiotic susceptibility testing, PCR-ribotyping, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis.....	65
6 Conclusões	86
Referências Bibliográficas.....	87

1 Introdução geral

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) constituem um dos maiores problemas de saúde pública no mundo devido ao elevado número de casos registrados anualmente e aos custos associados ao tratamento dessas doenças.

Embora haja subnotificação, um expressivo aumento no registro destas enfermidades tem ocorrido em diversos países. Somente em 2005, 1,8 milhões de pessoas morreram de diarreia em todo o mundo e alimentos ou água contaminados foram as principais causas citadas (PRIETO et al., 2009). *Salmonella* sp. tem sido apontada como o principal agente causal nessas doenças (MEAD et al., 1999; VALDEZATE et al., 2007), sendo que o número de surtos registrados envolvendo sorotipos de *Salmonella*, principalmente *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, tem aumentado paulatinamente ao longo das últimas três décadas (HERIKSTAD; MOTARJEMI; TAUXE, 2002; WALLACE et al., 2000).

O gênero *Salmonella* agrupa vários sorotipos estreitamente relacionados, muitos dos quais são potencialmente patogênicos para o homem e para os animais. As características epidemiológicas das cepas de *Salmonella* sp. envolvidas em surtos, tais como: sorotipo, susceptibilidade a antimicrobianos, emergência de padrões de multiresistência e perfil genotípico são muito importantes nos estudos epidemiológicos dos surtos (LEE et al., 1994, TASSIOS et al., 1997, MURESU et al., 2001, BOUVET et al., 2002; YAN et al., 2003; ASSEVA et al., 2006). Segundo trabalhos de pesquisa e relatos de órgãos de vigilância em saúde, ocorrem mais de um milhão de casos anuais de salmonelose no mundo (CDC, 2005). Tanto a gravidade das patologias relacionadas à *Salmonella* quanto sua resistência a antimicrobianos tem aumentado nas últimas décadas. Além disso, pesquisadores têm demonstrado que a resistência aos antibióticos nesse microrganismo está associada com um aumento da duração dos sintomas, do risco de hospitalização e do risco de doença invasiva (SHARMA et al. 2005; VALDEZATE et al., 2007).

Estima-se que, apenas nos Estados Unidos, esse microrganismo seja responsável por 30,6% dos óbitos e por 26% das hospitalizações por gastroenterite

relacionada a alimentos, representando a causa mais freqüente de infecções alimentares naquele país (MEAD et al., 1999, HEINITZ et al., 2000)

Há poucos estudos em relação à real incidência de *Salmonella* sp. no mundo. Algumas estimativas sugerem que somente 5 a 20% da população européia com gastroenterite buscam atendimento médico e somente uma pequena porcentagem necessite de hospitalização (WIT et al., 2001; WHEELER et al., 1999).

Programas internacionais, nacionais e locais de vigilância vêm sendo estabelecidos para monitorar a epidemiologia dos surtos, bem como para definir padrões de resistência a antimicrobianos, a fim de auxiliar no reconhecimento precoce (RDC nº12/2001, da ANVISA) exige a ausência de *Salmonella* sp. em 25g de alimentos, e a pesquisa desse microrganismo é solicitada em praticamente todas as classes de alimentos apresentadas nessa Resolução (BRASIL, 2001), salientando a importância do controle desse patógeno.

No Estado do Rio Grande do Sul (RS), esse microrganismo tem sido apontado como o principal agente responsável pelas DTA, nos últimos anos. Embora haja um número considerável de sorotipos de *Salmonella* identificados (mais de 2500) (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2003) e que muitos desses tenham sido encontrados em diferentes alimentos no RS (MICHAEL et al., 2006; BESSA et al., 2007, MÜRMANN et al., 2009), o sorotipo *S. Enteritidis* tem sido identificado como o responsável pela maioria dos casos e surtos de salmoneloses investigados pela Secretaria de Saúde do Estado, a partir do ano de 1999 (GEIMBA et al., 2004).

Estudos demonstraram que *S. Enteritidis* foi o sorotipo predominante nos surtos ocorridos no RS e que uma cepa predominante foi identificada entre a maioria dos isolados de alimentos envolvidos nos surtos de 1999 a 2002 (OLIVEIRA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). Todos os sorotipos de *Salmonella* são considerados potencialmente patogênicos, entretanto, alguns estudos buscam informações sobre a patogenicidade e as características que capacitam certas cepas a destacarem-se de outras, ocasionando os surtos alimentares em regiões específicas. Neste sentido, diversos estudos foram realizados investigando as características da cepa de *S. Enteritidis* causadora de surtos alimentares no RS (GEIMBA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007; CASARÍN et al., 2009; MALHEIROS et al., 2009 ; MACHADO, 2007 ; PEREZ et al., 2008).

Esses estudos agregaram informações importantes sobre esse microrganismo, tais como: *S. Enteritidis* foi o microrganismo identificado em 97% dos alimentos envolvidos em salmoneloses entre 1999 e 2000 (GEIMBA et al., 2004) e a cepa específica foi isolada em mais de 92% dos alimentos consumidos por indivíduos acometidos por salmonelose no período de 2001 a 2002 (OLIVEIRA et al., 2007). Esta cepa sobreviveu ao congelamento em hambúrguer de frango artificialmente contaminado por um período maior que as outras bactérias testadas (*Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*) (CASARÍN et al., 2009).

Além disso, esse microrganismo foi mais resistente ao hipoclorito de sódio em concentrações de 200 e 400 ppm quando comparado a *S. Typhimurim* e *S. Bredeney* (MACHADO, 2007). A cinética de crescimento também foi avaliada em meio de cultura e em maionese caseira (MALHEIROS et al., 2007), sendo que *S. Enteritidis* isolada de alimentos envolvidos em surtos apresentou taxa de crescimento superior aos outros sorotipos testados nas primeiras 6h de incubação. *S. Enteritidis* demonstrou também maior capacidade de adaptação ácida e resistência ao aquecimento (56°C e 60°C) que *S. Typhimurim* e *S. Bredeney*, indicando maior resistência e potencial de patogenicidade (MALHEIROS et al., 2009).

Também foi observado um aumento significativo na resistência a ampicilina (de 3,6% para 100%) e ácido nalidíxico (de 9,1 para 66,7%), dessa cepa em relação no período de 1999 a 2006 (GEIMBA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; de PAULA, 2006). De modo geral, o sorotipo *S. Enteritidis* tem apresentado menores níveis de resistência aos antimicrobianos que *S. Typhimurium*, particularmente *S. Typhimurium* DT104, a qual tem demonstrado níveis preocupantes de resistência em diversos países (YANG et al., 2002).

Independente do sorotipo, o desenvolvimento dessas resistências pode prejudicar o tratamento das infecções causadas por *Salmonella*, justificando a pesquisa e comparação da susceptibilidade a antimicrobianos em isolados de alimentos e de humanos, uma vez que o uso difundido de agentes antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal tem contribuído para o isolamento de bactérias resistentes em animais, as quais podem ser transmitidas aos humanos pela cadeia alimentar (PIDDOCK et al., 1993; RAJASHEKARA et al., 2000; YANG et al., 2002).

Esses dados reforçam a necessidade de dar continuidade na pesquisa epidemiológica das salmoneloses ocorridas no RS, através da caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *S. Enteritidis*. A avaliação dos perfis genotípicos e de resistência a antimicrobianos de isolados de material clínico humano e sua comparação com aqueles gerados a partir de isolados provenientes de alimentos, no mesmo período, podem auxiliar na identificação das possíveis fontes de contaminação. Além disso, a caracterização das cepas prevalentes pode ser útil na prevenção de problemas de saúde pública, permitindo o controle da disseminação de cepas resistentes através dos alimentos e, por consequência, a diminuição do número e da gravidade de casos e surtos de salmonelose no RS. Por esses motivos, os objetivos do presente trabalho foram:

- Avaliar a resistência a antimicrobianos de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos acometidos de salmonelose no Rio Grande do Sul, no período de 1999 a 2006.
- Caracterizar os perfis genotípicos das *Salmonella* Enteritidis isoladas, através de técnicas moleculares (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE e PCR-ribotipificação).
- Investigar a correlação entre as cepas isoladas de alimentos e as cepas isoladas de humanos.
- Investigar a correlação entre as cepas isoladas em regiões geograficamente distintas do RS.
- Determinar as possíveis origens da contaminação pelas cepas isoladas, no intuito de propor estratégias de controle.

2 Projeto de Doutorado

2.1 Título do projeto – Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* Enteritidis envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul no período de 1999 a 2005.

2.2 Equipe de Participantes:

- Eng. de Alim. Fernanda Arboite de Oliveira (ICTA/UFRGS)
- Prof. Dr Wladimir Padilha da Silva (orientador – UFPEL)
- Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo (co-orientador - ICTA/UFRGS)
- Prof. Dr. Jeverson Frazzon (pesquisador associado – ICTA/UFRGS)

2.3 Locais de Execução:

- Laboratório de Microbiologia de Alimentos (UFPEL)
- Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA, UFRGS).
- Laboratório de Microbiologia Molecular – Centro de Biotecnologia (UFRGS)

2.4 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO PROJETO

Salmonella é uma das principais causas de doenças veiculadas por alimentos em diversos países (PHILIPS; GEORGE, 1994; YANG et al., 2002), sendo responsável por sérios problemas de saúde pública e por significativas perdas econômicas. 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 (RELATÓRIOS ANUAIS de DTA, SES/DVD/RS, 2000). No período de 1997 a 1999, as Salmoneloses foram responsáveis pelo envolvimento de 8217 pessoas e 1557 hospitalizações, sendo que o maior número de surtos ocorreu na primavera e os alimentos mais comumente envolvidos foram àqueles preparados com ovos,

principalmente a maionese caseira (COSTALUNGA; TONDO, 2002). No ano de 2000, *Salmonella* foi apontada como o agente responsável por 47,4% do total de surtos alimentares investigados no RS. Além disso, estima-se que apenas uma pequena porcentagem dos casos de Salmonelose seja notificada aos órgãos de saúde pública, ressaltando, assim, a relevância do problema.

Dentro deste contexto, a caracterização das linhagens de *Salmonella* envolvidas em surtos alimentares assume um papel muito importante para o conhecimento das características específicas dessas linhagens 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 de *Salmonella* spp., sendo que caracterizações mais precisas requerem a utilização simultânea de diferentes métodos (LANDERAS et al., 1996; NASTASI; MAMMINA, 1996; EBNER; MATHEW, 2001). 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 alto poder de discriminação para a investigação destes microrganismos (MILLEMANN et al., 2000; AKIBA et al., 2003). Entre essas técnicas, pode-se destacar o RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) e a PFGE (Eletroforese de Campo Pulsado), as quais têm sido amplamente utilizadas na caracterização de *Salmonella* e investigações de surtos alimentares (LANDERAS et al., 1996; NASTASI; MAMMINA, 1996; EBNER; MATHEW, 2001; BETANCOR et al, 2004). Nestes estudos, as técnicas moleculares são empregadas após uma discriminação fenotípica das linhagens através de métodos como o bioquimismo, a sorologia, e a resistência a antimicrobianos, os quais são reconhecidos como a base de muitos estudos epidemiológicos moleculares (OLSEN et al., 1993).

O presente projeto propõe a caracterização fenotípica e genotípica das linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de alimentos e de humanos envolvidos em salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul, no período de 1999 a 2005.

2.5 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotípica e genotipicamente de isolados de *Salmonella* Enteritidis provenientes de alimentos e de humanos envolvidos em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul no período de 1999 a 2005.

2.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as linhagens de *Salmonella* Enteritidis através da resistência a antimicrobianos.
- Caracterizar as linhagens de *Salmonella* Enteritidis através das técnicas moleculares: Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) e Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).
- Investigar a possível correlação entre as linhagens isoladas de alimentos e as linhagens isoladas de humanos.
- Investigar a possível correlação entre as linhagens isoladas de regiões geograficamente distintas do Estado do Rio Grande do Sul.
- Possibilitar a investigação das prováveis origens de contaminação das linhagens isoladas, no intuito de propor estratégias de controle.

2.7 Hipótese

Há *Salmonella* spp. com características fenotípicas e genotípicas similares, causando Salmoneloses de origem alimentar no Rio Grande do Sul, no período de 1999 a 2005.

2.8. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

2.8.1 Características gerais do microrganismo

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae; são bastonetes Gram negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos, não fermentam a lactose (KONEMAN et al.,1997). A maioria, com exceção das *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum, são móveis através de flagelos peritríquios (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Todos os sorotipos de *Salmonella* são considerados potencialmente patogênicos, sendo o grau de virulência dependente da cepa, do hospedeiro e do meio ambiente (JAY, 2005).

O pH ótimo para a sua multiplicação encontra-se próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são considerados bactericidas. A aeração favorece o crescimento em pH baixo (FORSYTHE, 2002).

Salmonella multiplica-se, preferencialmente, em uma temperatura de incubação entre 35 e 37°C, mas existem relatos de crescimento em temperaturas entre 5 e 47°C (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Outro fator que afeta o crescimento de *Salmonella* é a umidade, avaliada através do parâmetro conhecido como atividade de água (a_w). O crescimento é inibido por valores de a_w menores que 0,94, sendo que o valor ótimo para o crescimento é de 0,95 (ICMSF, 1980).

2.8.2. Características Bioquímicas e Sorológicas

Após o isolamento a partir de amostras biológicas, aconselha-se a caracterização bioquímica e sorológica de *Salmonella* a fim de identificá-las com maior precisão. Tais procedimentos são muito importantes em vista da necessidade de confirmação da presença de *Salmonella* em determinada amostra, evitando resultados falso positivos ocasionados em virtude dos demais microrganismos presentes (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

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 o TSI, o LIA e o SIM e reações de descarboxilação de lisina, ornitina e arginina, usualmente positivas. *Salmonella* não apresenta atividade de hidrólise da uréia e não fermenta a lactose, sacarose, salicina e rafinose. Apresentam também, reações de indol e fenilalanina negativas.

A tipificação sorológica é realizada após a classificação bioquímica de *Salmonella*. Em virtude da grande variedade de sorotipos de *Salmonella* identificados, a caracterização sorológica desses microrganismos assume papel muito importante na investigação epidemiológica de surtos de salmoneloses alimentares. Atualmente, sabe-se que parcelas significativas de surtos são causadas por sorotipos específicos, principalmente por linhagens de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (DARWIN; MILLER, 1999; BAAY; IN'T VELT, 2000).

2.8.3 Classificação Taxonômica

A taxonomia do gênero *Salmonella* é baseada na composição de seus antígenos de superfície, os quais são os antígenos somáticos (O), os flagelares (H) e os capsulares (Vi). Este esquema de classificação proposto por KAUFFMAN (1972) divide o gênero *Salmonella* em sorotipos. No caso, o gênero *Salmonella* estaria dividido em duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*) e em mais de 2.500 sorotipos (BOOP et al., 1999).

A subespécie *enterica* agrupa as salmonelas associadas às infecções (principalmente gastroenterites) em humanos e animais de sangue quente, enquanto as demais subespécies e *S. bongori* são encontradas em animais de sangue frio e no meio ambiente (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Além da fórmula antigênica, a maior parte dos sorotipos são denominados conforme a síndrome relacionada (Typhi, Paratyphi, etc.), hospedeiro específico (Abortusovis, Abortusequi, Cholerasis, entre outros) ou origem geográfica dos primeiros isolamentos (London, Panamá, Canadá, etc.). Apesar da grande quantidade de sorotipos, em termos práticos, menos de 50 são realmente prevalentes e isolados mais frequentemente de infecções em humanos e animais (KILGER; GRIMONT, 1993).

2.8.4 Características das Salmoneloses

As doenças causadas por *Salmonella* spp. 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 (A, B e C) e as enterocolites, causadas pelas demais *Salmonella* (JAY, 2005).

A febre tifóide só acomete o homem e, normalmente, é transmitida por alimentos ou água contaminada com material fecal humano. O reservatório de *S. Typhi* é o homem e, em casos onde algumas pessoas podem se tornar portadores assintomáticos, estes são considerados 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 9 semanas (CLIVER, 1990).

Os sintomas da febre tifóide são causados pelo lipopolissacarídeo (LPS), que induz uma resposta inflamatória local durante a invasão da mucosa (CHALKER;

BLASER, 1988). Ao contrário da *S. Typhi*, não se sabe ao certo se as linhagens que causam doenças de origem alimentar (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) estão no interior dos macrófagos do fígado e do baço. Os sintomas das gastroenterites resultam, provavelmente, da invasão das células da mucosa. A *S. Typhi* causa uma infecção sistêmica, enquanto patógenos entéricos tais como *S. Typhimurium* raramente penetram além dos tecidos submucosos (CLIVER, 1990; JAY, 2000).

A doença mais comumente causada por *Salmonella* spp., a enterocolite resultante também da ingestão de produtos alimentícios ou água contaminada, é uma das mais freqüentes infecções de origem alimentar no mundo inteiro (FRANCO; LANGRAF, 1996).

Apesar de a enterocolite ser a mais branda das manifestações causadas por *Salmonella* spp., a alta freqüência dos casos é responsável por milhares de mortes todo ano. Somente nos Estados Unidos da América, estima-se que 800 a 4000 mortes ocorram devido à salmonelose. Os sintomas mais comumente associados a enterocolites são as diarreias com presença de sangue, vômitos, febre, dores abdominais e a desidratação, podendo resultar em morte (FORSYTHE, 2002).

Tais enfermidades têm sido responsáveis por grandes problemas de saúde pública e prejuízos econômicos decorrentes de 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 com surtos de salmonelose (JAY, 2005).

2.8.5 Controle das Salmoneloses

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).

Órgãos relacionados à saúde pública, assim como laboratórios prestadores de serviços contribuem para a prevenção de Salmoneloses, buscando 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 que venham acometer uma determinada localidade.

Para o sucesso destes objetivos, é preciso utilizar técnicas que tenham a capacidade de discriminar linhagens relacionadas ou não relacionadas epidemiologicamente, ou seja, correlacionar microrganismos isolados de locais e fontes distintas. Dentre as técnicas aplicadas na investigação de surtos alimentares, os métodos moleculares têm demonstrado bons resultados, devido a seu alto poder de discriminação (BETANCOR et al., 2004).

2.8.6 Resistência aos antimicrobianos

O uso difundido de agentes antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal tem contribuído para a ocorrência de bactérias resistentes em animais, as quais podem ser transmitidas aos humanos pela cadeia alimentar. O desenvolvimento dessas resistências pode prejudicar o tratamento das infecções causadas por *Salmonella*, justificando a pesquisa desses microrganismos na produção de alimentos e em surtos de origem alimentar (ZHAO et al., 2003).

MARTINS et al. (2000) testaram a resistência a antibióticos de 11 *Salmonella* sp. isoladas de miúdos de frango, sendo que sete desses isolados apresentaram resistência a dois ou mais dos cinco antibióticos testados.

Uma linhagem de *S. Typhimurium* DT104 resistente à ampicilina, ao cloranfenicol, à estreptomicina, às sulfonamidas e às tetraciclina (tipo R ACSSuT) foi isolada em 1984. Esse microrganismo foi isolado de carne bovina, de aves, de ovinos, de suínos e de eqüinos. Desde então, tal linhagem vem sendo isolada em diversos países. As terapias com antibióticos são realizadas extensivamente para o combate de infecções causadas por *S. Typhimurium* em animais, e a evolução de linhagens resistentes aos antibióticos mais comumente utilizados têm causado infecções difíceis de serem controladas (FORSYTHE, 2002).

BERCHIERI JR. & PAULILLO (1995), ao testarem a sensibilidade de 139 linhagens de 32 sorotipos de *Salmonella* isoladas de farinhas de origem animal destinadas à fabricação de rações, encontraram níveis de resistência à bacitracina,

penicilina e sulfazotrim (100%), à tetraciclina (77%), ao ácido nalidíxico (18%), à nitrofurantoína (2,16%), à amicacina (1,44%) e cefoxitina (0,7%).

De modo geral, *S. Typhimurium* tem apresentado maiores níveis de resistência aos antimicrobianos do que *S. Enteritidis*. Níveis preocupantes de resistência têm sido verificados em diversos países, principalmente, em linhagens como a *S. Typhimurium* DT104 (YANG et al., 2002), a qual já foi responsável por diversos surtos alimentares em humanos.

2.8.7 Tipificação Molecular

A necessidade de aplicação de métodos mais sensíveis na caracterização de *Salmonella* tem levado à utilização cada vez mais freqüente de técnicas moleculares.

De um modo geral, o envolvimento de linhagens específicas nos surtos de Salmonelose indica que essas linhagens apresentam características diferenciadas capazes de possibilitar sua disseminação entre determinadas populações. Com este enfoque, fica clara a necessidade de realizar estudos referentes à epidemiologia molecular e patogênese destas salmonelas.

Embora mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* tenham sido identificados, nos últimos anos os sorotipos Enteritidis e Typhimurium têm sido reconhecidos como os dois maiores agentes etiológicos de salmoneloses de origem alimentar em humanos (DARWIN; MILLER, 1999; BAAY; IN'T VELT, 2000).

Dentre os surtos causados por *S. Enteritidis*, diversos estudos moleculares sugerem que um número limitado de linhagens com características genéticas semelhantes vêm causando surtos em humanos (POWELL et al., 1994; GONZALEZ; MENDOZA, 1995; THONG et al., 1995; MURAKAMI et al., 1999; TSEN; LIN, 2001). Dessa forma, a comparação das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos e de humanos de uma mesma área geográfica pode fornecer informações epidemiológicas importantes.

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 autores, a análise molecular é útil também para a realização de levantamentos epidemiológicos e avaliação de medidas de controle.

Para realizar esses estudos diversas técnicas moleculares têm sido utilizadas, dentre elas o RAPD e o PFGE.

2.8.8 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Atualmente, técnicas derivadas de PCR (Polymerase Chain Reaction) têm demonstrado boa aplicabilidade para estudos epidemiológicos. Entre essas técnicas pode-se citar o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA; LIN et al., 1996); onde 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 espectro 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 *Salmonella* Enteritidis (BETANCOR et al., 2004).

Em um estudo com 125 amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de um surto alimentar, KANTAMA & JAYANETRA (1996) encontraram oito 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 *Salmonella* Enteritidis isoladas entre 1986 e 1996 em Hong Kong. Esses autores obtiveram seis perfis, com 2 a 11 fragmentos de DNA, com tamanhos entre 0,5 e 4 kb.

BETANCOR et al. (2004) utilizou cinco seqüências iniciadoras para caracterizar 62 linhagens 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 linhagens de *S. Enteritidis* relacionadas e não relacionadas com gastroenterites alimentares, sendo que 75% das linhagens foram agrupadas em um único perfil.

2.8.9 Eletroforese do Campo Pulsado (PFGE)

A PFGE, o qual separa fragmentos de DNA produzidos através da digestão do mesmo com enzimas de restrição específicas para seqüências alvo, tem sido utilizado como um método padrão de tipificação (OLSEN et al., 1993; TENOVER et al., 1995; GÜRTLER; MAYALL, 2001).

Essa técnica tem sido amplamente utilizada para caracterização genotípica de *Salmonella* (OLSEN et al., 1994; THONG et al., 1995; PUNIA et al., 1998; MURAKAMI et al., 1999; LIEBANA et al., 2001) e tem sido adotada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) como padrão para caracterização genotípica de desse microrganismo (CIMONS, 2000).

A PFGE é considerada uma ferramenta molecular bastante reprodutível e com alta capacidade de discriminação entre linhagens muito próximas dentro de uma mesma espécie (MATUSHEK et al., 1996), fator esse que pode ser bastante necessário no estudo em indústrias alimentícias e na investigação de diferentes surtos.

LEE et al. (1998) utilizaram a PFGE para demonstrar correlação entre 66 isolados de *Salmonella* Javiana provenientes de alimentos, de manipuladores e de indivíduos envolvidos em um surto de Salmonelose em Boston, Massachusetts. Segundo esses autores, essa foi a primeira utilização do PFGE para confirmar a transmissão de *S. Javiana* a partir de manipuladores ou alimentos.

Dentre as 250 amostras de *S. Enteritidis* provenientes de humanos e de animais, isoladas no período de 1995 a 2000, no Reino Unido, LIEBANA et al. (2004) encontraram, através do PFGE, 20 perfis genômicos, sendo um deles prevalente.

SENO et al. (2004) também utilizaram PFGE na caracterização de 106 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de humanos com diarreia, em Hiroshima, no Japão, no ano de 2001. Os autores encontraram 29 perfis entre os isolados.

Já BENDER et al. (2001) tipificaram, por PFGE, 958 *S. Typhimurium* isoladas de casos de infecções ocorridos entre 1994 a 1998 em Minnesota, EUA e encontraram 174 perfis distintos. Com base nos resultados obtidos, 16 surtos alimentares, envolvendo 154 casos, foram identificados como tendo a mesma origem. A tipificação por PFGE também permitiu a possível confirmação de 10 surtos envolvendo pequenos grupos em diferentes instituições e identificou um perfil específico para *S. Typhimurium* multi-resistente dentre as amostras analisadas.

Como consequência da estruturação de um grupo de pesquisa vinculado ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS), alguns resultados já foram alcançados após quatro anos de colaboração com a Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Estado. Até o momento, já foram analisados mais de 150 isolados de *Salmonella*, dos quais mais de 97% deles foram sorotipificados como *S. Enteritidis*. Além disso, já foram publicadas informações epidemiológicas importantes a respeito das Salmoneloses ocorridas no RS (COSTALUNGA; TONDO, 2002) e também sobre a prevalência de genes de virulência (*spvR* - *Salmonella* Plasmid Virulence) em parte dos isolados analisados (GEIMBA et al., 2004). Resultados parciais das análises moleculares (PCR-ribotipificação e RAPD) demonstraram a forte predominância de uma única linhagem, ou linhagens fortemente relacionadas, entre as *S. Enteritidis* analisadas. Tais resultados devem ser confirmados por demais análises moleculares (demais análises por PFGE e RAPD, tanto das amostras isoladas de alimentos quanto das amostras isoladas de coproculturas de humanos), as quais são o foco do presente projeto. Uma vez confirmado o predomínio de cepas com características similares, pretende-se investigar a presença das mesmas em nível de campo e indústria, a fim de propor estratégias de prevenção.

2.9 MATERIAIS E MÉTODOS

2.9.1 Amostragem

Amostras de alimentos envolvidos em surtos de salmoneloses e de espécimes clínicos (coproculturas) de humanos acometidos por Salmoneloses foram coletados em todo o Rio Grande do Sul pela Vigilância Sanitária do Estado durante o período de março de 1999 a dezembro de 2003. Dentre as amostras de alimentos, as quais já estão sendo estudadas em nosso grupo de pesquisa, serão coletadas aleatoriamente dez isolados de *S. Enteritidis* de cada ano do período de 1999 a 2003, perfazendo um total de 50 amostras. As amostras de coproculturas serão cedidas pelo Laboratório Central do Estado (LACEN/RS). Serão analisadas amostras isoladas a partir de coproculturas investigadas do mesmo período de 1999 a 2003, sendo que o número de isolados será determinado conforme disponibilidade e viabilidade das culturas existentes no LACEN/RS.

2.9.2 Isolamento e Identificação

As amostras que serão analisadas neste projeto de pesquisa foram isoladas e identificadas no LACEN/RS, segundo os métodos descritos pelo Food and Drug Administration (FDA, 1992). A sorotipificação foi realizada pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) segundo métodos preconizados por KAUFFMAN (1972).

2.9.3 Teste de Susceptibilidade a Antimicrobianos

A análise de susceptibilidade aos antimicrobianos será realizada de acordo com o método de difusão em disco segundo o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2000).

Os antibióticos que serão utilizados foram escolhidos de acordo com o NCCLS (2000) e BREUIL et al. (2000), e estão descritos a seguir: ampicilina (AMP); tetraciclina (T), neomicina (NEO), kanamicina (K), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT), gentamicina (GEN), ácido nalidixico, cloranfenicol (C) e estreptomicina (S).

2.9.4 Tipificação por RAPD

A tipificação molecular por RAPD será realizada no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICTA - UFRGS) conforme métodos descritos a seguir.

2.9.5 Extração de DNA

O DNA genômico será extraído por lise enzimática com lisozima, seguida de purificação com fenol – clorofórmio e posterior precipitação com etanol (SAMBROOK et al., 1989). O DNA será ressuspendido em Tris 10mM e EDTA 1mM, e sua concentração será determinada por espectrofotometria (JENSEN; HUBNER, 1996).

2.9.6 Seleção de seqüências iniciadoras

Na análise por RAPD, a seqüência iniciadora P1254 (5' CCGCAGCCAA 3') será utilizado. Esse *primer* foi selecionado por seu satisfatório poder de discriminação quando aplicado na tipificação de linhagens de *Salmonella* (LIN et al., 1996; LANDERAS; MENDOZA, 1998).

2.9.7 PCR

A PCR será realizada em um volume final de 25µL de solução contendo 2,5 µL de tampão de reação (100 mmol L⁻¹ Tris HCl, 750 mmol L⁻¹ KCl pH 8.8), 1,75µL de 50mM MgCl₂, 0,5µL de 10 mM dNTPs (5 mM de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2 µL da sequência iniciadora (20µmol) , 1U de *Taq* DNA polimerase 5U/µl (Biotools, Brasil), 16,05 µL de água MilliQ e 2µL da suspensão com o DNA bacteriano. Os tubos serão submetidos as seguintes condições de reação: 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 deverá incluir um controle negativo sem o DNA molde.

Os produtos da amplificação serão visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo sobre transluminador.

2.9.8 Tipificação por PFGE

A tipificação molecular por PFGE será realizada no Laboratório de Microbiologia Molecular, do Centro de Biotecnologia da UFRGS, utilizando o equipamento CHEF–DR III Variable Angle System da BIORAD®. O método de extração de DNA e restrição com endonucleases de restrição será realizado conforme preconizado por WEIDE-BOTJES et al. (1998) e está descrito a seguir:

A partir de estoque refrigerado, cada amostra de *Salmonella* spp. será semeada em 5mL de caldo cérebro–coração (BHI) estéril, sendo então incubados a 37°C por 18 horas. Em seguida, a Densidade Ótica (DO 578nm) dessa cultura será medida e o número de células equivalente a 5mL com DO de 0,3 será coletado e centrifugado por 15 minutos a 4000rpm. Logo após, o sobrenadante será desprezado e as células serão lavadas com 0,5mL de tampão pett IV (1M NaCl; 10mM Tris pH8,0; 10mM EDTA), agitadas em agitador Vortex e centrifugadas novamente a 4000rpm por 15 minutos. O sobrenadante será novamente desprezado, e as células acrescidas de 0,5mL de tampão pett IV e de 0,5mL de agarose baixo ponto de fusão a 2,5% a 56°C, sendo a suspensão dispensada em moldes plásticos para elaboração de cubos de agarose. Os moldes plásticos serão colocados em refrigerador por 10 minutos e então os cubos de agarose serão

transferidos para tubos contendo 3mL de solução de lise (1M NaCl; 10mM Tris pH 8,0; 200mM EDTA; 0,5% Sarkosyl; 0,2% deoxicolato de sódio) onde serão incubados por 2 horas a 37°C. Após incubação, a solução de lise será desprezada e 3mL de solução ESP (0,5M EDTA; 1% Sarkosyl) serão adicionados para incubação durante 18 horas a 56°C. No dia seguinte, a solução ESP será dispensada e os cubos serão lavados por 15 minutos com 3mL de água destilada sob temperatura ambiente com agitação suave. Em seguida, a água destilada será desprezada e 2mL de uma solução TE-PMSF (40mL de TE + 600uL de PMSF100mM) serão adicionados, deixando os cubos em agitação nessa solução a temperatura ambiente por 30 minutos. Esse processo será repetido mais uma vez e a solução TE-PMSF será retirada. Em seguida, os cubos serão lavados com água destilada, sob agitação, a temperatura ambiente por 15 minutos e depois lavados 2 vezes com solução TE, sob as mesmas condições, por 30 minutos. A solução TE será desprezada e os DNAs genômicos contidos nos cubos serão clivados com 20 unidades de enzima Xba I a 28°C por 4 horas. Após incubação, a reação enzimática será interrompida pela adição de 600µL de solução EDTA 0,5M. Os cubos de agarose serão resolvidos em gel de agarose 1,2%, em tampão TBE 0,5X, no aparelho CHEF–DR III Variable Angle System sob as seguintes condições: pulsos crescentes de 7 a 12 segundos durante as primeiras 11 horas e de 20 a 40 segundos nas 13 horas seguintes, 200 volts e temperatura de 14°C. Após corrida, o gel será corado com solução de brometo de etídio (0,5µg/mL, Sigma) por 20 minutos e descorado em água destilada por mais 20 minutos, sendo então analisado em Sistema GEL DOC 1000 Gel Documentation (BIORAD).

2.9.10 Análise Estatística dos resultados

A capacidade de discriminação das técnicas de RAPD e PFGE será avaliada pela determinação numérica do Índice de Discriminação (ID) segundo o método descrito por HUNTER e GASTON (1988).

Os dendogramas para avaliação da similaridade genética das linhagens serão construídos através da utilização do software SPSS, versão 11.5.

2.10 CRONOGRAMA

Atividades	Trimestres															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Avaliação da resistência antimicrobianos	X	x														
RAPD			x	x	x											
PFGE					x	x	x	x	X	X						
Análise dos resultados										x	x	x	X			
Elaboração de artigos científicos			x									x		X	X	
Elaboração da tese															X	X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIBA, M. et al. Comparison of *Salmonella* enterica serovar Abortusequi isolates of equine origin by pulsed-field gel electrophoresis and fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 379-388, 2003.

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**, v. 74, p. 243-247, 2000.

BANWART, G. J. **Basic Food Microbiology**. 2 Ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1989.

BENDER, J. B. et al. Use of Molecular Subtyping in Surveillance for *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 345-350, 2001.

BERCHIERI, A e PAULILLO, A. C. *Salmonella* em um Abatedouro Avícola. **Ars Veterinária**, v.3, p. 81-87, 1995.

BETANCOR, L. et al. Random Amplified Polymorphic DNA and Phenotyping Analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry

in Uruguai from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, 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 of Clinical Microbiology**, v. 36, p.1549–1554, 1998.

BOOP, C. A. et al. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. **Manual of clinical Microbiology**, 7th ed., p. 467, 1999.

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.

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

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

CIMONS, M. Rapid food-borne pathogen ID system is making a difference. **ASM News**, v.66, p. 617–619, 2000.

CLIVER, D. O. **Foodborne disease**. London, Academic Press, 1990.

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

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

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**, v. 205, p. 25-29, 2001.

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

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artimed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

GEIMBA, M. P. et al. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in South of Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 1229-1233, 2004.

GONZALEZ HEVIA, M.A., MENDOZA, M.C. Polymorphism of rRNA genes and plasmid analysis in the typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from a Spanish health area. **New Microbiologica**, v.18, p. 377–384, 1995.

GÜRTLER, V., MAYALL, B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 3–16, 2001.

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

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**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

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

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. 6 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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**, 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 of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 3452–3460, 2001.

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**, v.27, p. 119-125, 1996.

KAUFFMAN, F. **Serological diagnosis of *Salmonella* species**. Munksgaard, Copenhagen, 1972.

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

KONEMAN, E. K.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnostic Microbiology**. 5 Ed. New York: Lippincott, 1997.

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**, v. 40, p. 27–34, 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**, v. 47, p. 427–434, 1998.

LANDERAS, E. et al. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella* enteritidis by ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2294-2296, 1996.

LEE, R. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Genomic Digests Demonstrates Linkages among Food, Food Handlers, and Patrons in a Food-Borne *Salmonella javiana* Outbreak in Massachusetts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 284-285, 1998.

LIEBANA, E et al. Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 189–195, 2004.

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

LIN, A.W., USERA, A.M., BARRET, T.J., GOLDSBY, R.A. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 870-876, 1996.

LING, J.M., KOO, I. C., KAM, K. M., CHENG, A. F. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1693-1699, 1998.

MATUSHEK, M. G. et al. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electroforesis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2598-2600, 1996.

MILLEMANN, Y., LESAGE-DESCAUSES, M.C., LANFONT, J.P., CHASLUS-DANCLA, E. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 173-179, 1995.

MILLEMANN, Y. et al. Evaluation of IS200-PCR and Comparasion with Other Molecular Markers To Trace *Salmonella enterica* subsp. enterica Serotype Typhimurium Bovine Isolates from Farm to Meat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2204-2209, 2000.

MURAKAMI, K., HORIKAWA, K., OTSUKI, K. Epidemiological analysis of Salmonella Enteritidis from human outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, p. 439– 442, 1999.

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

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

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

PHILIPS, C.A.; GEORGE, J. T. Guess what's lurking in the lunch? **Biologist**, v. 41, p. 76-80, 1994.

POWELL, N.G., THRELFALL, E.J., CHART, H., ROWE, B. Subdivision of *Salmonella* Enteritidis PT4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, p. 193–198, 1994.

PUNIA, P. et al. Pulsed-field electrophoretic fingerprinting of *Salmonella indiana* and its epidemiologic applicability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 103–107, 1998.

RELATÓRIOS ANUAIS de ETA. Secretaria Estadual de Saúde e do Meio Ambiente. Divisão de Vigilância Sanitária: 1987-1998. Porto Alegre, (2000). Não paginado.

SENO, M.; SAKAKI, M.; OGAWA, H. Genotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolates from sporadic patients in limited areaduring one year. **Journal of Infection**, v. 49, p. 291–296, 2004.

TENOVER, F.C. et al. Interpreting choromossomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel eletrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

THONG, K.L., NGEOW, Y.F., ALTWEGG, M., NAVARATNAM, P., PANG, T. Molecular analysis of *Salmonella* Enteritidis by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1070–1074, 1995.

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

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

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**, v. 86, p. 295-301,2002.

ZHAO S, QAIYUMI S, FRIEDMAN S, et al. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5366–5371, 2003.

WEIDE-BOTJES, M. et al. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar: evaluation and aplication of different typing methods. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 215-227, 1998.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Doenças Transmitidas por Alimentos

A incidência de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), bem como sua notificação, tem aumentado no mundo todo (NORRUNG; BUNCIC, 2008; SOFOS, 2008). Além disso, observa-se, a preocupação dos órgãos de vigilância em saúde de diversos países em criar redes e sistemas de vigilância epidemiológica para notificação dessas doenças e caracterização dos seus principais agentes causais (SWAMINATHAN et al., 2001; BIEDENBACH et al., 2006; STREIT et al., 2006; THRELFALL et al., 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ocorrem, no mundo, 14 milhões de casos de toxinfecções alimentares, 60 mil hospitalizações e 1.800 mortes por ano (WHO, 2004).

Nos Estados Unidos estima-se entre seis e 33 milhões de casos de DTA por ano, com cerca de 5.000 casos resultando em morte (MEAD et al., 1999), e gastos de cerca de seis milhões de dólares anuais para o tratamento dessas doenças, porém, estas cifras não incluem as perdas geradas nos sistemas de produção e comércio (LEITNER, 2004). Na Inglaterra, segundo Wheeler et al. (1999), ocorrem cerca de 9,4 milhões de casos de DTA por ano, sendo que apenas um em cada 136 casos é notificado aos serviços de saúde pública.

No sul da América do Sul, no período compreendido entre 1995 e 2001, 38,1% dos surtos de DTA notificados ocorreram no Brasil, 24,8% no Chile, 11,1% na Argentina, 8,3% no Peru, 8,2% no Uruguai, 6,3% no Paraguai e 3,2% no Equador. Porém, a avaliação destes dados deve ser cautelosa, pois além da subnotificação, os levantamentos epidemiológicos podem ser precários em alguns países, não refletindo a realidade. Nestes mesmos países, foram relatados 406 surtos e 16.304 casos de salmonelose nesse período (FRANCO et al., 2003).

De acordo com o Sistema de Monitorização de Doenças Diarréicas Agudas do Ministério da Saúde (MDDA/MS), somente no ano de 2004, ocorreram no Brasil cerca de 2.400.000 casos de DTA. Dados do Sistema de Informações Hospitalares (SIH) demonstraram que no período de 1999 a 2004 ocorreram mais de 3.400.000

internações hospitalares causadas pela ingestão de alimentos contaminados, sendo que no período de 1999 a 2002 ocorreram, em média, 6.320 óbitos por ano (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - SVS, 2005).

Sabe-se, no entanto, que no Brasil há dificuldades de levantamento e acesso aos dados epidemiológicos referentes às DTA, já que os serviços de Vigilância Sanitária são organizados de forma praticamente independente nos estados e municípios e apresentam dificuldades expressivas em termos de pessoal técnico disponível, equipamentos, laboratórios de apoio e sistemas informatizados.

Numa tentativa de mudar esse quadro, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), do Ministério da Saúde, desenvolveu o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos (VE-DTA). Esse sistema foi implantado em 1999, em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e o Instituto Pan-Americano de Alimentos da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). O início das notificações de surtos de DTA ocorreu em 1999 e até 2004, foram notificados ao Ministério da Saúde 3.737 surtos, dos quais 80% (2.989) foram concluídos sem dados sobre o agente etiológico, 8,4% pelo critério clínico-epidemiológico e somente 15,5% (581) foram confirmados através de análise laboratorial de material clínico e/ou alimentos envolvidos. Nesses surtos em que o agente etiológico foi identificado, *Salmonella* sp. foi o agente responsável em 34,7% (202/581) enquanto *Staphylococcus aureus* em 11,7%. Neste mesmo período, mais de 73.517 pessoas foram acometidas por DTA, com registro de 38 óbitos (SVS, 2005).

O Rio Grande do Sul é um dos poucos estados brasileiros onde há dados epidemiológicos sobre DTA há mais de 20 anos. Esses dados, embora possam não refletir com exatidão a realidade sobre essas doenças no Estado devido ao problema da subnotificação, são bastante importantes para que sejam adotadas medidas de controle e prevenção.

A investigação dos surtos é realizada em conjunto pela Divisão de Vigilância Epidemiológica e a Divisão de Vigilância Sanitária Estadual (DVS/RS) e, geralmente, é feita após uma denúncia ou notificação. Após as notificações de um surto à Vigilância, é realizada a coleta de amostras clínicas, de alimentos e de informações epidemiológicas. Os alimentos suspeitos são encaminhados para o Laboratório

Central do Estado (LACEN/RS) ou, quando necessário, a outros laboratórios de universidades, onde são realizadas as análises laboratoriais e de caracterização dos microrganismos isolados dessas amostras (SILVEIRA, 2005).

3.2 *Salmonella* sp. e salmonelose

Salmonella é reconhecida em todo o mundo como um dos principais microrganismos causadores de DTA (LEE et al., 1994, TASSIOS et al., 1997, MURESU et al., 2001; BAGER; HELMUTH, 2001, BOUVET et al., 2002, IZUMIYA et al., 2003; ASSEVA et al., 2006).

Infecções por *Salmonella* são uma preocupação mundial e estima-se que 95% dessas infecções são de origem alimentar. (HALD et al., 2004). O número de casos da doença, com base em dados do FoodNet (CDC, 2005), é de 147 casos por milhão de pessoas, sendo que 40% dos casos ocorrem em indivíduos menores de 15 anos.

A contaminação dos produtos alimentícios com *Salmonella* gera graves conseqüências para a saúde e perdas econômicas consideráveis, o que tem estimulado alguns pesquisadores a investigar a capacidade de sobrevivência e as vias de transmissão deste organismo em diferentes animais (WINFIELD; GROISMAN, 2003).

Em São Paulo, de 23 surtos de salmonelose avaliados, 22 foram causados por alimentos contendo ovos, sendo que a grande maioria desses foi associado ao consumo de ovos crus ou com cocção insuficiente. Apenas um surto foi relacionado ao consumo de carne de aves (PERESI et al., 1998).

No Rio Grande do Sul, segundo dados da Secretaria Estadual da Saúde, a salmonelose tem sido a DTA de maior ocorrência desde 1993 (GEIMBA et al., 2004).

Tendo em vista a importância da salmonelose entre as DTA no RS, muitos estudos têm sido realizados buscando identificar a origem e os veículos de transmissão dessa doença no Estado (COSTALUNGA; TONDO, 2002; SANTOS et al., 2002, SILVEIRA; TONDO, 2006). Costalunga e Tondo (2002) avaliaram os surtos de DTA ocorridos no período de 1997 a 1999, e relataram que *Salmonella* foi responsável por 35,7% dos 323 surtos alimentares investigados. Além disso, verificaram que os alimentos preparados com ovos crus sem inspeção, principalmente a maionese caseira, foram os principais responsáveis pelos surtos de

salmonelose. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Nadvorny et al. (2004) e por Oliveira et al. (2007). Nadvorny et al (2004) analisaram os surtos causados por *Salmonella* sp no RS, em 2000, e observaram que os alimentos preparados com ovos tiveram uma prevalência expressiva nesses surtos (72%). Já de acordo com Oliveira et al. (2007), no período de 2001 a 2002, 30,4% (24/79) dos alimentos envolvidos em surtos de salmonelose no RS, eram preparações à base de ovos.

3.3 Fatores de virulência e mecanismos de patogenicidade de *Salmonella* sp.

A expressão de genes nas bactérias pode ser influenciada por uma variedade de fatores, tais como temperatura, osmolaridade, teor de oxigênio, pH e peptídeos com atividade antimicrobiana, os quais podem afetar sua sobrevivência e virulência (GALÁN; CURTISS, 1990; RHEN; DORMAN, 2005). Em *Salmonella enterica* um complexo sistema regulatório coordena a expressão de fatores de virulência, permitindo a adaptação desse patógeno a mudanças no ambiente (FAHLEN et al., 2000; RHEN; DORMAN, 2005; BEN-BARAK et al., 2006).

Estes genes são encontrados associados em cassetes de genes e operons, chamados de Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* sp. (SPI). As Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* sp. (SPI) codificam para uma série de fatores de virulência, estabelecendo interações específicas com o hospedeiro. Cinco SPI já foram identificadas, sendo que a SPI1 é necessária para a invasão de células epiteliais e indução da apoptose dos macrófagos (MILLS et al., 1995; AMAVISIT et al., 2003; RHEN, DORMAN, 2005). Já as SPI 2, 3 e 4 são necessárias para o crescimento e sobrevivência da bactéria dentro dos macrófagos. Genes relacionados à invasão (*invA*) e virulência (*avrA*) estão localizados na SPI-1 (MILLS et al., 1995; AMAVISIT et al., 2003). O gene *invA* tem sido amplamente utilizado como alvo para identificação de *Salmonella* por real-time PCR (MALORNY et al., 2003, 2007; JACOBSEN; HOLBEN, 2007; NOVINCAK et al., 2007). O gene *avrA*, por outro lado, está envolvido na indução da morte programada das células e na resposta inflamatória do hospedeiro à infecção (BEN-BARAK et al., 2006).

Genes presentes na SPI 1 e 2 codificam o Sistema de Secreção tipo III (TTSS), cuja função é formar um canal entre o interior e o exterior da membrana bacteriana, permitindo o transporte de proteínas diretamente do citoplasma da

bactéria para o citoplasma da célula hospedeira (OHL; MILLER, 2001; HURLEY; McCORMICK, 2003; SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Resumidamente, as infecções por *Salmonella* iniciam com a ingestão de água ou alimento contaminados. Após a ingestão, se o microrganismo sobreviver ao pH estomacal, se adere às células do epitélio através de diversos mecanismos, especialmente fímbrias (RYCHLIK; BARROW, 2005). Após a adesão às células apicais da superfície intestinal, ocorrem profundos rearranjos no citoesqueleto das células do hospedeiro, induzindo a formação de dobras na membrana que englobam a bactéria em grandes vesículas (OHL; MILLER, 2001). Uma vez dentro da célula, a bactéria permanece em um vacúolo e é transportada através do citoplasma, entrando na lâmina própria, via endocitose. Em seguida, inicia-se o processo de inflamação e a liberação de prostaglandinas, causando desequilíbrio eletrolítico, o que resulta em diarreia (PATEL et al., 2005). A severidade da infecção e a permanência ou disseminação sistêmica dependerá da resistência do hospedeiro e da virulência das cepas (DARWIN; MILLER, 1999; JIMÉNEZ; CASTRO, 2003).

3.4 Adaptação e resistências ácida e térmica em *Salmonella* Enteritidis

Geralmente os patógenos aumentam sua resistência aos ácidos mediante exposição a baixo pH, em níveis subletais, durante a fase de crescimento exponencial (LEYER; JOHNSON, 1992; JORDAN et al., 1999; PHAN THANH; MAHOUI; ALIGE, 2000).

Salmonella apresenta respostas adaptativas induzidas em diversas condições de estresse, incluindo presença de ácidos, de sais e aumento de temperatura de incubação (INGRAHAM, 1987). Isolados exibindo maior resistência térmica e ácida podem aumentar a capacidade de sobrevivência ao tratamento térmico e a passagem pelo estômago (HUMPHREY et al., 1995).

Wilde et al. (2000) relataram que a tolerância ácida e térmica de isolados de *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis PT4 foi nitidamente mais elevada quando as células foram cultivadas, durante a fase estacionária, em triptona de soja comercial (TSB) ou infusão cérebro-coração (BHI) contendo glicose, do que quando as células foram cultivadas em qualquer caldo nutriente de triptona.

Em termos moleculares, um fator sigma da RNA polimerase (RpoS) é induzido na fase estacionária de crescimento de *Salmonella*. Este fator regula um grupo de sistemas genéticos que contribuem para aumentar a virulência, a

resistência térmica e osmótica e a resistência ao estresse oxidativo o que, em geral, contribui para o aumento do potencial de sobrevivência de *Salmonella* (DODD et al., 1997). O fator sigma RpoS é necessário para a transcrição de diversos genes envolvidos na adaptação de *Salmonella* ao estresse ambiental, assim como estresse oxidativo, falta de nutrientes e choque ácido (FANG et al., 1999).

Segundo Humphrey et al. (1995), a fase de crescimento em que a *S. Enteritidis* se encontra influencia a sua destruição pelo calor e pela acidez, sendo que a bactéria se torna mais resistente na fase estacionária. Os autores também demonstraram que o valor D (tempo para inativar 90% da população de microrganismos a uma dada temperatura), com as culturas na fase estacionária, foi significativamente maior para isolados provenientes de humanos que para isolados oriundos de frangos.

Malheiros et al. (2007) avaliaram a cinética de crescimento, a resistência ácida e a resistência térmica de uma cepa de *S. Enteritidis* isolada de alimentos envolvidos em surtos no RS e compararam com cepas de *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* não provenientes de surtos. Em meio de cultura, a cinética de crescimento a 30°C foi semelhante para todos os sorotipos, porém, em salada de batata com maionese, *S. Enteritidis* apresentou maior taxa de crescimento nas primeiras 6 horas de incubação. No que se refere à resistência ácida e térmica, a exposição a diferentes pH e temperaturas demonstrou que *S. Enteritidis* apresentou maior capacidade de adaptação ácida que *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* e, tanto as células de *S. Enteritidis* ácido adaptadas quanto aquelas que não sofreram adaptação ácida, apresentaram maior resistência térmica em temperaturas superiores a 56°C.

Kanellos e Burriel (2005) observaram que *S. Enteritidis* foi mais resistente ao ácido láctico que *S. Typhimurium* e *S. Indiana*, confirmando que sorotipos diferentes podem apresentar resistências diferentes. Contudo, a termoresistência de sorotipos de *Salmonella* pode ser aumentada devido a alterações na acidez, atividade de água, microbiota acompanhante, alteração no conteúdo de sólidos totais, mudanças na formulação ou características dos alimentos (DOYLE; MAZZOTA, 2000).

Perez (2008) estudou a sobrevivência de sorotipos de *Salmonella* em fluido gástrico simulado (pH 1,5) e a sua capacidade de invasão intestinal. Cepas de

ácido-adaptadas apresentaram uma sobrevivência significativamente maior ($p < 0,05$) que *S. Typhimurium* ácido-adaptadas e também que as cepas não adaptadas de *S. Enteritidis*. Os mesmos pesquisadores demonstraram que *S. Enteritidis* ácido-adaptadas apresentaram maior contagem no íleo-ceco que as outras cepas, sugerindo que a adaptação ácida influenciou na capacidade de invasão deste microrganismo.

3.5 Aderência de *Salmonella* sp. a superfícies

O fenômeno da formação de biofilme por *Salmonella* em superfícies utilizadas no processamento de alimentos tem sido bastante estudado (SINDE; CARBALLO, 2000; JOSEPH et al, 2001; GIAOURIS; NYCHAS, 2006).

A adesão bacteriana a superfícies depende de muitos fatores, incluindo a natureza do material, a energia livre, a hidrofobicidade e a composição química da superfície, bem como a presença de proteínas (HOOD; ZOTOLLA, 1997; CARBALLO et al., 1992; SINDE; CARBALLO, 2000).

Giaouris e Nychas (2006) avaliaram a formação de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis PT4, em aço inoxidável, após 18 dias de incubação. Os autores relataram que esse sorotipo foi capaz de formar um biofilme consistente, chegando a 10^6 UFC/cm² quando o meio de cultura foi repostado.

A capacidade desse sorotipo em aderir ao aço inoxidável e ao polietileno foi avaliada por Machado (2007). Esses autores verificaram que não houve diferença significativa nos níveis de aderência do sorotipo *S. Enteritidis* quando comparado aos sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Bredeney*.

3.6 Resistência de *Salmonella* sp. a sanificantes

Borowsky et al. (2006) avaliaram a sensibilidade e resistência de 96 amostras de *S. Typhimurium* isoladas de suínos, no Rio Grande do Sul, frente aos compostos quaternário de amônio e iodofor em diferentes tempos de contato. Foi constatado que as amostras de *S. Typhimurium* testadas apresentaram sensibilidade ao quaternário de amônio em cinco minutos de exposição, porém o mesmo resultado só foi atingido com iodofor com um tempo de contato de 60 minutos.

A resistência de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* e *S. Bredeney* aos desinfetantes ácido peracético, hipoclorito de sódio e compostos quaternários de amônio foi avaliada por Machado (2007), utilizando o teste de suspensão com presença de matéria orgânica. Os autores demonstraram que, nas concentrações indicadas pelo fabricante, os três compostos foram capazes de inativar os três sorotipos de *Salmonella*. Entretanto, na concentração de 200ppm de hipoclorito de sódio, comumente utilizada em indústrias de alimentos, o sorotipo *S. Enteritidis* foi o mais resistente, uma vez que sobreviveu até 15 minutos de exposição ao sanificante.

3.7 Técnicas fenotípicas de caracterização de *Salmonella* sp.

Uma caracterização detalhada das cepas é essencial para o sucesso de investigações epidemiológicas. As principais técnicas fenotípicas utilizadas para esse fim são a sorologia e o perfil de resistência à antibióticos. A Fagotipificação também tem sido utilizada para diferenciação de cepas, mas essa técnica só está disponível para um número limitado de sorotipos (RIDLEY; THRELFALL; ROWE, 1998).

3.7.1 Sorotipificação e importância do sorotipo *S. Enteritidis* nas salmoneloses

Sorotipificação é amplamente usada para classificar isolados de *Salmonella* dentro de sorogrupos de acordo com a variabilidade de seus antígenos de superfície. Esta técnica é baseada na classificação sorológica do lipopolissacarídeo (antígeno O), das proteínas flagelares (antígeno H) e polissacarídeos capsulares (antígeno Vi). O esquema de Kauffmann–White, geralmente usado para a classificação de sorotipos de *Salmonella* reconhece 46 sorotipos O e 114 antígenos H, resultando em 2523 diferentes sorotipos (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2003). Além disso, é também uma ferramenta de caracterização fenotípica que pode ser usada em estudos epidemiológicos para o acompanhamento das tendências e variações de sorotipos ao longo do tempo (OLSEN et al., 1994; BRENNER; MCWHORTER-MURLIN, 1998; JOHNSON et al., 2001).

A classificação através de sorologia foi reconhecida como técnica padrão para a classificação de *Salmonella* em investigação de surtos antes do

desenvolvimento de métodos moleculares de tipificação (BELTRAN et al., 1988; OLSEN et al., 1993; BURR et al., 1998).

Os sorotipos predominantes mudam ao longo do tempo e diferem de uma área geográfica para outra, sendo que atualmente o sorotipo *S. Enteritidis* é o mais isolado em diversas partes do mundo, inclusive no Brasil (RODRIGUE et al., 1990; STANLEY et al., 1992; LANDERAS et al., 1996; SCUDERI et al., 1996; NYLEN et al., 1999; LACONCHA et al., 2000; LOPALCO et al., 2000; TAVECHIO et al., 2002).

Nos Estados Unidos e em muitos países da Europa, como Inglaterra e Itália, desde 1980, relata-se uma grande incidência de surtos de salmoneloses relacionados com o consumo de ovos ou alimentos contendo ovos contaminados com *S. Enteritidis* (PERALES; AUDICANA, 1989; RODRIGUE et al., 1990; SILVA; DUARTE, 2002). *S. Enteritidis* também foi o principal sorotipo envolvido nos casos de salmonelose na Bulgária no período de 1999 a 2004 (ASSEVA. et al., 2006).

A pandemia de *S. Enteritidis* pode ter começado em meados da década de 1980 quando esse sorotipo passou a ser o mais freqüentemente isolado a partir de humanos e de animais em diversas partes do mundo (PERALES; AUDICANA, 1989; RODRIGUE et al., 1990; SILVA; DUARTE, 2002).

Tavechio et al (1996) utilizaram a classificação por sorologia em 5.490 isolados de *Salmonella* entre os anos de 1991 e 1995, em São Paulo. Os autores encontraram 81 sorotipos diferentes, sendo que *S. Enteritidis* correspondeu a somente 1,2% do total de isolados em 1991, passando a 2% em 1992, 10% em 1993, 43,3% em 1994 e atingindo 64,9% em 1995. Num período posterior, também no Estado de São Paulo, Tavechio et al. (2002) identificaram 123 sorotipos distintos ao analisarem 4.581 cepas de *Salmonella* isoladas de fontes não-humanas, sendo que a *S. Enteritidis* continuou o sorotipo prevalente (32,7%), seguido de *S. Senftenberg* (10,3%), *S. Hadar* (6,8%), *S. Agona* (5,1%) e *S. Typhimurium* (2,4%).

Na Europa, nos anos de 2000 e 2002, *S. Enteritidis* totalizou 79 e 84%, respectivamente dos isolados de humanos (CDC, 2005). Dados do Enter-Net confirmam essa prevalência, porém com proporções um pouco menores: 68 e 71% (FISHER, 2004).

Resultados de investigações epidemiológicas de surtos de salmoneloses ocorridos na Europa, Estados Unidos e em outras regiões do mundo reforçam a importância de alimentos contaminados com *S. Enteritidis* como o principal veículo

de infecção para o homem e destacam o perigo potencial para a saúde da população (KUHN, 1995; NASTASI; MAMMINA, 1996, GEIMBA et al., 2004).

Esse sorotipo vem sendo isolado tanto em fontes humanas quanto de alimentos, emergindo como um grande problema econômico e de saúde pública (SILVA; DUARTE, 2002).

No período de janeiro de 1990 a dezembro de 1999, no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, foram isoladas 324 cepas de *Salmonella*, sendo 155 de infecções humanas e 169 de alimentos destinados ao consumo humano. Dos 17 diferentes sorotipos identificados a partir de infecções humanas, *S. Enteritidis* foi o predominante (75%). A prevalência desse sorotipo foi observada também nos isolados de alimentos (56,2%) (ALMEIDA, 2000).

De acordo com dados da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul, em 1990, *S. Typhimurium* foi isolada de 86% dos alimentos envolvidos em salmoneloses e não houve relatos envolvendo *S. Enteritidis*. No entanto, no ano de 1993, *S. Enteritidis* foi encontrado em 64% dos alimentos relacionados aos surtos, enquanto *S. Typhimurium* foi isolada em apenas 4% desses alimentos (GEIMBA et al., 2004). A predominância desse sorotipo manteve-se no período de janeiro de 2003 a junho de 2006, quando, das 130 amostras analisadas, 114 (87,7%) foram sorotipificadas como *S. Enteritidis* (de PAULA, 2006).

O aumento repentino no isolamento de *S. Enteritidis* pode ser atribuído ao sucesso das campanhas de erradicação de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, causadoras do tifo aviário e da diarreia bacilar em frangos. Essas campanhas possibilitaram a abertura de um novo nicho ecológico que vem sendo ocupado, desde então, por este sorotipo (BÄUMLER et al., 2000).

Embora a *S. Enteritidis* tenha sido freqüentemente envolvida com as salmoneloses no RS nos últimos anos, outros sorotipos têm sido encontrados em alimentos ou no ambiente de indústrias de alimentos. Como exemplo disso, Bessa et al. (2004) demonstraram que os sorotipos *S. Bredeney* e *S. Typhimurium* foram isolados em 12% e 24,3%, respectivamente, das 300 amostras de suínos analisadas. Em outro estudo, Castagna et al. (2004) sorotipificaram *Salmonella* sp. isoladas de 60 amostras de suínos portadores, encontrando 24,1% de *S. Bredeney* e 20,7% de *S. Typhimurium*. No mesmo estudo, foram isoladas 33,8% de *S. Bredeney* e 11,0% de *S. Typhimurium* em amostras de massa utilizadas na fabricação de

embutidos tipo frescal. Entretanto, cabe ressaltar que há poucos registros do envolvimento do sorotipo *S. Bredeney* em surtos alimentares no RS e atualmente, *S. Typhimurium* raramente tem sido envolvida em DTA, nesse Estado.

No período de 1999 a 2000, *S. Enteritidis* foi o sorotipo predominante no RS, uma vez que 76 (97%) cepas de *Salmonella* sp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos no Rio Grande do Sul, pertenciam a esse sorotipo (GEIMBA et al., 2004). Num período posterior, 2001 a 2002, dentre as cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos envolvidos em surtos no mesmo Estado, 93% (79/85) pertenciam ao sorotipo *S. Enteritidis*. (OLIVEIRA et al., 2006). Apesar disso, as características fisiológicas que permitiram a esse sorotipo tornar-se o principal patógeno alimentar no RS e em diversos países ainda não estão completamente esclarecidas, ressaltando a importância de pesquisas sobre esse microrganismo.

3.7.2 Fagotipificação

A técnica de fagotipificação é uma das ferramentas mais comumente empregadas para a diferenciação primária de isolados de *Salmonella*. Desde 1950 a fagotipificação tem sido a técnica de escolha para a diferenciação entre cepas de um mesmo sorotipo nos laboratórios de referência,, embora apresente restrições quanto a custos, demanda de tempo e pessoal capacitado, aliado ao fato de que nem todos os sorotipos de *Salmonella* possuem sistemas de fagotipificação padronizados (THRELFALL; FROST, 1990; RIDLEY; THRELFALL; ROWE, 1998).

Pang et al. (2005) utilizaram essa técnica para tipificar 107 cepas de *S. Enteritidis* isoladas na Alemanha e identificaram 27 fagotipos, sendo o fagotipo PT4 o mais prevalente (29,9%). Esse mesmo fagotipo foi o mais encontrado entre os isolados de Taiwan (TSEN; LIN, 2001; PANG et al., 2005, 2007).

A fagotipificação tem sido usada para monitorar a disseminação de cepas específicas de *S. Enteritidis*. No entanto, tornou-se claro que a maioria dos isolados de *S. Enteritidis* pertencem a um limitado número de fagotipos. Na Europa Ocidental, PT4 (50,3%), PT1 (13,4%) e PT8 (8,2%) foram os fagotipos predominantes para isolados clínicos durante o período de 1998 a 2003 (FISHER et al., 2004).

Fernandes et al. (2003) analisaram 105 isolados de *S. Enteritidis* no Estado de São Paulo, no período de 1975 a 1995 e verificaram que o fagotipo PT-8 predominou no período de 1975 a 1992. No período subsequente (1993 a 1995) PT-

4 foi o fagotipo prevalente. Nesse mesmo Estado, Peresi et al. (1998) avaliaram os principais fagotipos de *S. Enteritidis* isoladas de fezes de pacientes acometidos de salmonelose (n= 87) e de alimentos envolvidos em surtos (n=38 amostras de 18 surtos), no período de 1993 a 1997, e verificaram que o fagotipo PT-4 foi prevalente, com 80,5% dos isolados de coproculturas e todos os isolados de alimentos pertencendo a esse fagotipo.

Também no RS, Santos et al. (2004) verificaram que o fagotipo PT-4 predominou entre isolados de *S. Enteritidis* oriundos de carcaças de frango, alimentos e material clínico de humanos envolvidos em casos de salmonelose.

Embora a fagotipificação seja útil na subtipificação de *S. Enteritidis* de diferentes fontes, essa técnica apresenta poder de discriminação insuficiente quando um único fagotipo é predominante em isolados de várias origens e num grande intervalo de tempo, sendo necessário utilizar métodos adicionais de caracterização (FERNANDES et al., 2003).

3.7.3 Susceptibilidade de *Salmonella* sp. a antimicrobianos

A análise da resistência a antimicrobianos tem sido bastante utilizada, juntamente com outros métodos de tipificação, para caracterização de *Salmonella enterica* tanto no Brasil (BESSA et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2006; GEIMBA et al., 2004), quanto em países como Espanha (CARRAMIÑANA, et al., 2004), Singapura (LING; WANG, 2001), Korea (YANG et al., 2002), Tailândia (PADUNGTO; KANEENE, 2006), França (BIENDO et al., 2005), Senegal (STEVENS et al., 2008), Grécia (TASSIOS et al., 1997), entre outros (SWAMINATHAN et al., 2001; BIEDENBACH et al., 2006; STREIT et al., 2006; THRELFALL et al., 2006).

De modo geral, *S. Typhimurium* tem apresentado maiores índices de resistência aos antimicrobianos que *S. Enteritidis* e, portanto, vêm apresentando perfis fenotípicos mais variados, como no caso de *S. Typhimurium* DT 104, a qual apresenta resistência cromossômica à ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, cloranfenicol e sulfonamidas. Essa característica foi observada por Yang et al. (2002) ao estudarem o perfil de multiresistência de *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* isoladas de animais. Os autores verificaram uma ocorrência de 100% de *S. Typhimurium* multiresistentes (resistente a mais que dois antimicrobianos) e de apenas 21% para *S. Enteritidis*. Breuil et al. (2000), na França, também observaram

valores baixos de multiresistência dentre amostras de *S. Enteritidis* isoladas de indivíduos acometidos de salmonelose e de animais infectados, nos anos de 1994 e 1997. Esses autores relatam ainda, que *S. Typhimurium*, o outro sorotipo mais predominantemente encontrado, apresentou altas taxas de resistência aos antimicrobianos testados.

Em conjunto com o aumento de registros de casos de salmonelose, a Organização Mundial da Saúde (OMS) verificou um aumento na incidência de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos, bem como a emergência de linhagens multiresistentes oriundas de animais e de humanos (BRISABOIS et al., 1997; BIEDENBACH et al., 2006; PRIETO et al., 2009). Assim, existe a necessidade de vigilância e de investigação para abordar a questão do desenvolvimento da resistência antimicrobiana em cepas isoladas de alimentos e de humanos e de seu controle, já que uma vez estabelecidas, essas resistências podem prejudicar o tratamento das infecções causadas por esse microrganismo (KIESSLING et al., 2002, ANTOINE et al, 2006).

Apesar de a gastroenterite ser a síndrome mais freqüente, *Salmonella* também pode ocasionar enfermidades extra-intestinais severas, como por exemplo, bacteremias, meningites ou osteomielites (BUTAYE et al., 2006). Quando o tratamento com antimicrobianos era necessário, ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprim foram as drogas de escolha durante muitos anos. No entanto, por causa do aumento da resistência a esses antimicrobianos, o uso de fluoroquinolonas (em adultos) e cefalosporinas de amplo espectro (em crianças) tem se tornado comum (HOHMANN, 2001; THRELFALL, 2002; PARRY, 2003). O extensivo uso de antimicrobianos na medicina humana, veterinária e em rações animais como promotores de crescimento tem sido apontado como uma das causas do aumento na disseminação de bactérias resistentes a determinadas drogas (CRUCHAGA et al., 2001; THRELFALL et al., 2006).

Estudos têm demonstrado resistência a antimicrobianos em *Salmonella* isoladas de alimentos de origem animal e de humanos (BOONMAR et al., 1998; HANSON et al., 2002), inclusive resistência a antimicrobianos relativamente novos, como azitromicina e ciprofloxacina (ISENBARGER et al., 2002), sugerindo a propagação de cepas resistentes transmitidas da cadeia alimentar para humanos. No entanto, há limitadas informações sobre a correlação entre as cepas de

Salmonella isoladas de alimentos e as isoladas de humanos. Além disso, devido à complexidade das vias de transmissão de *Salmonella* dos alimentos de origem animal para humanos, é difícil atribuir ao uso de antimicrobianos em animais os problemas de saúde em humanos (PHILLIPS et al., 2004).

Segundo Silva e Duarte (2002), as linhagens de *S. Enteritidis* provenientes de aves têm apresentado alta sensibilidade aos antibióticos de uso comum em avicultura, incluindo as quinolonas. Entretanto, o aumento da resistência a agentes antimicrobianos e o surgimento de cepas multiresistentes têm sido observados em isolados de origem clínica.

Em um estudo realizado na Inglaterra e País de Gales, que avaliou a incidência de resistência em *S. Enteritidis* relacionada ao uso de antimicrobianos em medicina veterinária, foi observado que o aumento da utilização de tetraciclina não teve impacto significativo na ocorrência de resistência a essa droga. Ao mesmo tempo, o declínio no uso de trimetoprima não refletiu na redução da ocorrência de resistência a este antimicrobiano em *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (THRELFALL et al., 2006). Porém, Cruchaga et al. (2001) ao estudarem a incidência de resistência em 1.710 isolados de *Salmonella* provenientes de animais (238 amostras), de humanos (1.051 amostras) e de alimentos (421 amostras), na Espanha, durante o ano de 1998, observaram que o perfil de resistência aos antimicrobianos, encontrado nas amostras isoladas de humanos, foi muito similar ao encontrado nas amostras isoladas de alimentos.

Antibióticos como tetraciclinas e sulfonamidas têm sido amplamente utilizados na produção de suínos no Brasil, e este fato pode explicar as altas taxas de resistência que foram encontradas por Mürmann et al. (2009) em isolados de *Salmonella* provenientes de lingüiça suína do tipo frescal. Por outro lado, o uso de cloranfenicol na produção animal foi proibido no Brasil há mais de dez anos e os mesmos pesquisadores observaram resistência a esse antibiótico em 27,8% nas cepas analisadas.

A resistência ao ácido nalidíxico tem sido associada com diminuição da susceptibilidade às fluoroquinolonas. Isso é observado através da resistência ao ácido nalidíxico, associado ao aumento da concentração inibitória mínima (CIM) da ciprofloxacina (PIDDOCK, 2002). Além disso, resistência a cefalosporinas devido à

produção de β -lactamases também tem sido observada em diferentes sorotipos, em diversos países (PARRY, 2003; YAN et al., 2003, GORMAN; ADLEY, 2004).

Threlfall et al. (2003) conduziram um estudo sobre susceptibilidade de *Salmonella* a antimicrobianos, em 10 países europeus, e verificaram que 14% dos isolados de *Salmonella* exibiram resistência ao ácido nalidíxico (CIM > 16 mg mL⁻¹), com concomitante diminuição da susceptibilidade à ciprofloxacina (CIM 0,25-1,0 mg mL⁻¹). Além disso, 0,5% dos isolados clínicos apresentaram resistência à ciprofloxacina (CIM > 1,0 mg mL⁻¹). Outros estudos observaram resultados semelhantes, entre os quais se destacam um estudo na Finlândia, que documentou a redução da suscetibilidade à ciprofloxacina, a uma taxa de 6,4% para isolados coletados durante o período de 1995 a 1999 (HAKANEN et al., 2001). O mesmo estudo constatou que um aumento anual na resistência à fluoroquinolona durante o período do estudo foi confirmado pela análise de regressão logística. Em outro estudo, realizado na Dinamarca durante o período de 1995 a 2000, foi observado um aumento da resistência ao ácido nalidíxico de 0,8% em 1995 para 8,5% em 2000 (MOLBAK et al., 2002). O aumento da resistência a essa classe de antimicrobianos de uso terapêutico em humanos pode acarretar falhas no tratamento das salmoneloses e o desenvolvimento de resistência *in vivo* às fluoroquinolonas, o que reduz a eficácia frente a infecções invasivas por *Salmonella* (PIDDOCK et al. 1993; KRISTIANSEN et al., 2003; RUPALI et al., 2004).

Na última década, tem sido observado um aumento na freqüência de altos e moderados níveis de resistência ao ácido nalidíxico e fluoroquinolonas, respectivamente, em isolados clínicos do sorotipo *S. Enteritidis* (GUERRA; SCHRORS; MENDOZA, 2000; SOTO et al., 2001, CERRO; SOTO; MENDOZA, 2003).

No RS, entre os anos de 1999 e 2006 foi observado um aumento na resistência ao ácido nalidíxico em *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em surtos. Em 1999, 9,1% dos isolados eram resistentes a esse antibiótico, sendo que em 2006 este percentual chegou a 66,7%. Além disso, apesar da ciprofloxacina ter se mantido entre os antimicrobianos com maiores percentuais de sensibilidade, houve um aumento na resistência intermediária neste período (GEIMBA et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006, de PAULA, 2007).

Apesar da resistência em *S. Enteritidis* ser considerada menor que a resistência apresentada por algumas cepas de *S. Typhimurium* (YANG et al., 2002), é cada vez mais freqüente o isolamento de *S. Enteritidis* resistentes (BREUIL et al., 2000).

Threlfall et al.(2006) analisaram a resistência a tetraciclina, trimetoprim, ampicilina e ácido nalidíxico e ciprofloxacina em cepas de *S. Enteritidis* e de *S. Typhimurium*, os dois sorotipos prevalentes em infecções humanas na Inglaterra e País de Gales, nos anos de 2000, 2002 e 2004. Os autores observaram que a incidência de *S. Enteritidis* com resistência ao ácido nalidíxico e com diminuição da suscetibilidade à ciprofloxacina aumentou significativamente (11% para 26%) entre 2000 e 2004, enquanto os níveis gerais de resistência em *S. Typhimurium* caíram 25%. Para *S. Enteritidis*, os fatores relacionados ao aumento da incidência de resistência foram estrangeiros em viagem e o consumo de alimentos importados contaminados com cepas resistentes. Para esse sorotipo, a resistência a pelo menos um antimicrobiano aumentou de 19% em 2000 para 35% em 2004. Os níveis de resistência múltipla continuaram baixos, com menos de 3% dos isolados apresentando essa característica. Também foi observado um aumento na incidência do fagotipo PT1 com resistência ao ácido nalidíxico e diminuição na susceptibilidade à ciprofloxacina, de 43% em 2000 para 76% em 2004.

Num estudo realizado no estado de São Paulo, Fernandes et al. (2003) avaliaram a resistência a antimicrobianos de 105 *S. Enteritidis* e verificaram altos índices de susceptibilidade, sendo que 66,7% foram sensíveis a todas as drogas testadas. Os autores observaram que todas as cepas multirresistentes (8,5%) foram isoladas de pacientes hospitalizados.

No estado do Rio Grande do Sul, diversos estudos têm sido delineados com o objetivo de avaliar o perfil de resistência/suscetibilidade de linhagens de *S. Enteritidis* envolvidas em surtos de DTA. Geimba et al. (2005) avaliaram a resistência a antimicrobianos de 73 *S. Enteritidis* isoladas de alimentos envolvidos em salmoneloses ocorridas entre 1999 e 2000, e verificaram que 37% apresentaram resistência à estreptomicina, 13,7% foram resistentes à neomicina e 13,7% à gentamicina. A maioria das cepas foi sensível a todas as drogas testadas, contudo, a resistência a mais de uma droga foi verificada em 23% das cepas, e uma delas foi resistente a quatro antimicrobianos diferentes (neomicina, canamicina,

estreptomicina e ácido nalidíxico). Oliveira et al. (2006), analisaram 79 *S. Enteritidis* isoladas de alimentos relacionados aos surtos ocorridos no período de 2001 a 2002. Os autores demonstraram que, também nesse período, a maior parte das cepas analisadas foi sensível a todos os antimicrobianos testados, sendo que as maiores porcentagens de resistência foram verificadas para o ácido nalidíxico (21,5%), gentamicina (12,7%), e estreptomicina (11,4%). A multiresistência foi observada em 16,46% das cepas, sendo que duas foram resistentes a quatro drogas e uma foi resistente a três antimicrobianos. Já Vaz et al. (2007) estudaram *S. Enteritidis* (n=96) isoladas de alimentos e humanos envolvidos em surtos de salmonelose e de produtos avícolas, e observaram que 43,75% apresentaram sensibilidade a todos os 12 antimicrobianos testados. As maiores porcentagens de resistência foram observadas para sulfonamidas (33,33%), trimetroprima-sulfametoxazol (25%) e ácido nalidíxico (14,58%).

No mesmo Estado, de Paula (2006) analisaram 114 *S. Enteritidis* isoladas entre janeiro de 2003 e junho de 2006, e verificaram que 63,16% apresentaram resistência múltipla. Já Oliveira et al (2005) avaliaram a resistência a antimicrobianos de *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango, alimentos e humanos, encontrando resistência múltipla em 51,6% dos isolados entretanto, não foi verificada resistência à ciprofloxacina, e cerca de 90% dos isolados foi resistente a pelo menos um antimicrobiano.

A resistência a antimicrobianos geralmente decorre da aquisição de genes de resistência carregados por plasmídeos ou transposons, trocados entre bactérias da mesma espécie ou entre diferentes espécies. Na ausência de pressão seletiva, estes elementos podem ser perdidos e como o uso clínico de antibióticos difere de país para país, é esperado que surjam diferentes padrões de resistência entre cepas de *Salmonella* sp. isoladas de humanos em diferentes países (NORMARK; NORMARK, 2002; MAISNIER-PATIN et al., 2002; GILLESPIE et al., 2005; BUTAYE et al., 2006). Assim, diferentes cepas podem desenvolver padrões de resistência semelhantes, da mesma forma que isolados pertencentes ao mesmo grupo clonal podem diferir no perfil de sensibilidade (ARBEIT, 2001).

É importante salientar que algumas medidas vêm sendo tomadas para reduzir a emergência de cepas resistentes. Dentre essas se destaca que a União

Européia passou a proibir o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento em animais, partir do ano de 2006 (CAPRIOLI et al., 2000).

3.8 Técnicas moleculares de caracterização de *Salmonella* sp.

A caracterização molecular de linhagens patogênicas é fundamental para fins epidemiológicos. Nas últimas décadas, a identificação de linhagens bacterianas baseada em características fenotípicas cedeu espaço para as abordagens genotípicas realizadas através de técnicas de biologia molecular. Técnicas baseadas na análise do genoma bacteriano têm sido amplamente utilizadas para caracterização genotípica de isolados clínicos de *Salmonella* associados com infecções nosocomiais. Em estudos epidemiológicos de doenças infecciosas, existe frequentemente um interesse na identificação de fontes de infecção e vias de transmissão. Pressupõe-se que o isolado de um organismo patogênico, com um genótipo idêntico ou similar a outro, tem um ancestral comum, ou seja, esses patógenos apresentam uma relação clonal (UPHOLT, 1977; OLSEN et al., 1993; SALAMON et al., 2000; LIEBANA et al., 2003).

Quando se podem obter informações demonstrando proximidade geográfica e temporal, a similaridade genética pode indicar uma fonte comum de infecção (TENOVER et al., 1995; SALAMON et al., 2000). Assim, uma estimativa precisa da similaridade genética é um fator crítico para fazer inferências sobre as rotas de transmissão.

O princípio básico dessas técnicas é que isolados epidemiologicamente relacionados são provenientes da expansão clonal de um único precursor e partilham características que diferem das de isolados independentes. A utilidade de uma determinada característica (fenotípica ou genotípica) para a caracterização está relacionada com a sua estabilidade dentro de um grupo clonal e sua diversidade dentro da espécie, o que reflete a diversidade genética evolutiva decorrente de mutações não-letais ao longo do tempo (MASLOW et al., 1993).

As técnicas de tipificação molecular para caracterização de isolados de *Salmonella* que usam restrição com endonucleases, digestão e amplificação de ácidos nucléicos, ou seqüenciamento do DNA bacteriano servem para evidenciar a ocorrência de relações epidemiológicas entre os diferentes isolados (KOSTMAN et al., 1992; MILLEMANN et al., 1996; TSEN et al., 2000). Cada técnica de tipificação tem suas vantagens e desvantagens, uma vez que uma que satisfaça a todas as

necessidades de caracterização desse patógeno ainda não foi desenvolvida (YAN et al., 2003).

Quatro critérios devem ser considerados: a rapidez, a reprodutibilidade, a finalidade, bem como a capacidade de diferenciar isolados com fenótipos semelhantes que são independentes geneticamente (CERRO et al., 2002).

Entre as técnicas moleculares mais utilizadas para tipificação de *Salmonella* sp. estão a Pulsed-field gel electrophoresis (MIRAGAIA et al, 2002, TENOVER et al, 1995), a Ribotipificação (NAIR et al., 2000) e aquelas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR): PCR-RFLP (SHAH; ROMICK, 1997), ERIC-PCR (KUMAO et al., 2002), REP-PCR (BEENNASAR et al., 2000), RAPD (BETANCOR et al., 2004) e PCR-ribotipificação (JENSEN et al., 1993; NASTASI; MAMMINA, 1995; JENSEN; HUBNER, 1996; LAGATOLLA et al., 1996; LUZ et al., 1998; BAUDART et al., 2000).

As técnicas baseadas na PCR têm sido bastante utilizadas por serem consideradas de fácil execução, rápidas, relativamente mais baratas, adequadamente específicas e reprodutíveis. Como exemplo disso, a PCR-ribotipificação tem sido adotada por diversos autores nos estudos epidemiológicos de *Salmonella enterica* (RAJASHEKARA et al., 2000). Esta se baseia no princípio de que as seqüências de DNA do *operon* ribossomal estão presentes de uma a onze cópias no cromossomo bacteriano. Embora os genes do rRNA sejam altamente conservados, as regiões espaçadoras entre os genes 16S e 23S apresentam alto grau de variação nas seqüências moleculares, dentro de uma mesma espécie. Por isso, essas diferenças podem ser utilizadas para caracterizar bactérias em nível de subespécie (OLSEN, et al. 1993, GURTLE; STANISICH, 1996, HAIN et al., 1997).

Nastasi e Mammina (1995) demonstraram que a PCR-ribotipificação foi de fácil execução, rápida e reprodutível no estudo de 45 *S. Typhimurium* isoladas de surtos ocorridos na Itália. Em outro trabalho, os mesmos autores utilizaram essa técnica para tipificar 405 *S. Enteritidis*, encontrando 15 diferentes perfis (NASTASI; MAMMINA, 1996). Cerro et al. (2002) encontraram três perfis de PCR-ribotipificação para 117 amostras de *Salmonella* sp. isoladas a partir de produtos de origem animal. Millemann *et al.* (2000) também utilizaram a PCR-ribotipificação com o objetivo de caracterizar 85 *S. Typhimurium* isoladas em produtos de origem animal e obtiveram cinco grupos com diferentes perfis de bandas. Oliveira et al. (2009) analisaram por

PCR-ribotipificação, 152 *S. Enteritidis* provenientes de alimentos envolvidos em salmoneloses ocorridas no RS no período entre 1999 e 2002, encontrando apenas dois perfis genéticos (R1 e R2). Ambos os perfis foram bastante similares e o perfil R1 agrupou 94,7% dos isolados.

Embora ainda pouco utilizado na caracterização de linhagens envolvidas em surtos de DTA, o sequenciamento de DNA oportuniza uma boa diferenciação entre cepas (SPRINGER et al., 2001). O sequenciamento de DNA pode ser bastante útil na confirmação da similaridade clonal de *S. Enteritidis*. Através do sequenciamento de partes ou de todo o genoma de microrganismos patogênicos, é possível identificar a seqüência completa de nucleotídeos de uma região específica ou de todo o cromossomo de um microrganismo, ao invés de analisar apenas sítios de restrição ou genes específicos como ocorre em outras técnicas moleculares de tipificação. Por outro lado, para grandes genomas ou quando um grande número de isolados é comparado, o tempo e o custo necessários para o sequenciamento impedem, muitas vezes, a utilização dessa técnica (CHRISTENSEN et al., 2000).

Christensen et al. (2000) indicam que a tipificação de bactérias através da comparação de seqüências de DNA apresenta alta precisão. Estes autores também utilizaram o sequenciamento de DNA para avaliar as variações nas regiões espaçadoras 16S-23S do rRNA de 18 sorotipos de *Salmonella*. As pequenas variações nessas seqüências foram causadas por mutações pontuais que permitiram diferenciar 15 dos 18 sorotipos investigados.

Oliveira et al. (2009) sequenciaram um fragmento de 600pb, obtido por PCR-ribotipificação a partir de amostras de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos. A análise da seqüência do fragmento gerado revelou alto grau de similaridade, o que confirma os resultados obtidos por esses pesquisadores através de outras técnicas moleculares.

Além das inserções e/ou supressões, a variação das seqüências intergênicas pode ser atribuída a estruturas secundárias e, por vezes, à presença de genes tRNA, a qual é muito freqüente em bactérias gram-negativas (LUZ et al., 1998). Lehner et al. (1984) relataram que *E. coli* K-12 e *S. enterica* LT2 apresentam sete *operons* localizados em locos equivalentes nos mapas genéticos dos cromossomos de cada microrganismo. Em três deles, as regiões espaçadoras intergênicas contêm dois genes tRNA, um para alanina e outro para isoleucina. Os

outros quatro *operons* têm um único gene tRNA de ácido glutâmico (CONDON; SQUIRES, C.; SQUIRES, C.L, 1995). A presença do tRNA-Ala e tRNA-Ile foi observada em todas as cepas seqüenciadas no estudo realizado por Oliveira et al. (2009). No entanto, nenhuma das cepas analisadas por estes autores apresentou o gene tRNA-Glu. Resultados semelhantes foram relatados por Chiu et al. (2005). Por outro lado, Christensen et al. (2000) encontraram os genes que codificam para tRNA-Ile, tRNA-Ala e tRNA - Glu nas regiões intergênicas de 25 cepas de *Salmonella* pertencentes a 18 diferentes sorotipos.

A Eletroforese em Campo Pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis -PFGE) é uma das técnicas mais aceitas e utilizadas para a tipificação de *Salmonella* (TENOVER et al, 1995; MIRAGAIA et al, 2002). PFGE é utilizada tanto para estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções (MAGALHÃES et al., 1997; DARINI et al., 1999), quanto para a comparação entre populações bacterianas, ampliando o escopo epidemiológico da técnica (LIU et al., 1999). Não existe uma estratégia universal para tipificação molecular de *Salmonella*, no entanto, PFGE é geralmente considerado "padrão ouro" para tipificação de bactérias entéricas, e é o método de referência utilizado na maior rede de subtipificação molecular de doenças de origem alimentar (Pulsenet) (SWAMINATHA et al., 2001).

Através de PFGE são resolvidos fragmentos gerados pela digestão com enzimas de restrição de corte infrequente que clivam o DNA bacteriano total, previamente incorporado em pequenos blocos de agarose (MASLOW et al., 1993). Essa técnica é considerada a mais fidedigna para tipificação bacteriana (MURASE et al., 1995; WHITTAM; BERGHOLZ, 2007), sendo muito utilizada para discriminar linhagens bacterianas dentro de uma mesma espécie (LINDSTEDT et al., 2000). Tem se mostrado eficaz para estudos epidemiológicos de alguns sorotipos de *Salmonella enterica* (OLSEN et al. 1994; POWELL et al., 1994; BAGGESEN et al., 1997, 2000; PUNIA et al., 1998, LUKIMAA et al., 1999; LIEBANA et al., 2003; LYTIKAINEN et al., 2000).

Atualmente, o PFGE é considerado confiável e sensível para detectar diferenças entre cepas estreitamente relacionadas, de modo que isolados indistinguíveis através de perfis de PFGE podem ser classificados como

epidemiologicamente relacionados com um elevado grau de confiança (WHITTAM; BERGHOLZ, 2007).

Diferentes perfis de PFGE podem ser gerados devido à aquisição de elementos genéticos móveis, como os plasmídeos, ou de novos conjuntos de genes por transdução (BRUSSOW et al., 2004), portanto, padrões de PFGE com um único fragmento de DNA de diferença podem ser considerados como um perfil distinto. Essa abordagem tem sido utilizada por vários pesquisadores (THONG et al., 1995; LACONCHA et al. 1998, FERNANDEZ et al., 2003). Com esses critérios, e de acordo com as orientações publicadas por Tenover et al. (1995), os isolados com uma a três bandas de diferença podem ser considerados estreitamente relacionados (clones).

No entanto, protocolos convencionais de PFGE podem não conseguir discriminar as sutis diferenças genotípicas entre isolados de *S. Enteritidis*, portanto, o uso de mais de uma enzima de restrição pode aumentar o poder discriminatório da técnica para aplicação na tipificação de membros desse sorotipo. (ZHENG et al., 2007).

Vários relatos documentam baixos níveis de diversidade genética entre *S. Enteritidis* isoladas de fontes diversas, reforçando o fato de que a maioria dos isolados de *S. Enteritidis* são altamente clonais (OLSEN et al., 1994, LIEBISCH; SCHWARZ, 1996; THONG et al., 1996; TSEN et al., 1999; MARÉ et al., 2001; GORMAN; ADLEY, 2004; SAAED et al., 2006; PANG et al. 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

Com base na alta sensibilidade e poder de discriminação das técnicas moleculares, essas podem ser empregadas na tipificação de *S. Enteritidis* causadoras de surtos alimentares em diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Sul, a fim de correlacioná-las. Dessa forma, os isolados desse sorotipo podem ser comparados entre si, identificando se uma ou várias cepas diferentes foram responsáveis pelas salmoneloses. Sendo assim, a identificação de cepas específicas de *S. Enteritidis* em uma região geograficamente definida, pode ser o passo determinante na identificação precisa de fontes de contaminação e prevenção dessas enfermidades.

Para fins de vigilância epidemiológica e para avaliar a propagação de clones específicos e sua prevalência nas populações por grandes períodos, seria

importante em doenças como a salmonelose, a construção das chamadas "bibliotecas" de perfis genotípicos. As técnicas empregadas para a obtenção de tais perfis devem ser facilmente padronizáveis, bem como deve ser adotada uma nomenclatura uniforme dos perfis. A questão da padronização é particularmente importante já que através dela seria possível a reprodutibilidade e a comparação entre diferentes laboratórios, favorecendo o fluxo de informações epidemiológicas (STRUELENS et al., 1998).

Pelo exposto, uma única técnica não pode ser utilizada para discriminar isolados de *S. Enteritidis*. A abordagem mais eficaz e confiável para estudos epidemiológicos de *S. Enteritidis* é através de uma combinação de técnicas fenotípicas e genotípicas. As informações genéticas, utilizadas em conjunto com os perfis de resistência aos antibióticos, poderiam ajudar a detectar o aparecimento de novas linhagens, através de variações genéticas, e também a disseminação de resistência aos antimicrobianos entre as linhagens já caracterizadas.

**4 ARTIGO 1: Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar
Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil**

(publicado no periódico Food Control, v. 20, p. 606-610, 2009 - ISSN: 0956-7135)

5 ARTIGO 2: Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples based on antibiotic susceptibility testing, PCR-ribotyping, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis

(submetido ao periódico Foodborne Pathogens and Diseases - ISSN: 15353141)

Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples based on antibiotic susceptibility testing, PCR-ribotyping, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis

Fernanda Arboite de Oliveira^{1,2*}, Ana Paula Pasqualotto¹, Wladimir Padilha da Silva² and Eduardo Cesar Tondo^{1*}

¹Departamento de Ciências de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA/UFRGS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Pelotas, Brazil

Mailing Address: ICTA/UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43212, Campus do Vale, Agronomia, CEP 91501-970, Caixa Postal 15090, Porto Alegre, Brazil. E-mail: fernandaarboite@yahoo.com

Abstract

This study aimed to characterize *Salmonella* (S.) Enteritidis isolated from blood (n=12) and feces (n=68) of salmonellosis victims in Southern Brazil. All isolates were submitted to antimicrobial susceptibility testing, PCR-ribotyping, and XbaI macrorestriction Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Results demonstrated high rates of ampicillin and nalidixic acid resistance, and strains isolated from victims living in different geographic regions were clustered together, presenting a common resistance profile. All strains demonstrated similar PCR-ribotyping patterns (R1, R2, and R3); being that the predominant profile R1 grouped 47.5 % of the strains. PFGE profile P1 grouped the majority of the strains (96.25 %), suggesting a clonal relationship among the strains. Results suggested that a specific strain of *S. Enteritidis* were involved in several salmonellosis outbreaks occurred in Southern Brazil.

Introduction

Although the difficult to estimate the incidence of the foodborne diseases, according to the World Health Organization (WHO), there are annually about 17 million cases of acute gastroenteritis or diarrhea and 3 million deaths caused by non-typhoidal salmonellosis being associated to contaminated food or consumption (Rabsch et al., 2001; Ling & Wang, 2001; Prieto et al., 2009).

It was estimated that salmonellosis was responsible for 25.6 % of the total hospitalizations and 30.6% of the deaths associated with foodborne diseases in the United States (Heinitz et al., 2000).

The incidence and severity of diseases related to *Salmonella* have increased in recent decades. The WHO has reported an alarming increase of resistant *Salmonella* from animals and human sources (Brisabois et al., 1997). Thus, efforts to study *Salmonella* strains isolated from human patients are important.

Several typing methods have been used to investigate foodborne pathogens, and the search for the best one continues. Focusing on this purpose, four criteria must be considered when chosen a typing method: rapidity, reproducibility, case of

use, and the ability to differentiate strains with similar phenotypes which are genetically unrelated.

Salmonella isolates are traditionally distinguished by serotyping based on the immuno-chemical structure of the lipopolysaccharide and flagella. This system has identified more than 2500 serotypes worldwide (Popoff et al., 2003), however the discriminatory power of this method is considered low. Antibiotic susceptibility testing has been applied to investigate the resistance of pathogenic strains and also to type *Salmonella* strains (Carramiñana, et al., 2004; Geimba et al., 2004; Bessa, 2005; Biendo et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Padungtod e Kaneene, 2006; Stevens et al., 2008). Genotypic typing methods have been considered better to discriminate *Salmonella* in epidemiological surveillance studies and also to investigating foodborne outbreaks. In recent years, many DNA-based genotyping techniques have been utilized to delineate epidemiological relationships between various isolates (Kostman et al., 1992; Millemann et al., 1996; Tsen et al., 2000), being that PCR-ribotyping and PFGE have been applied in many studies because the former is considered not expensive and easy to perform, while the latter is currently the “gold standard” of the typing methods (Swaminathan et al., 2001; Soto et al., 2002; Cerro et al., 2003; Gudmundsdottir, 2003; Gatto et al., 2006; Oliveira et al., 2009) .

S. Enteritidis remains the most prevalent serotype infecting humans worldwide. The World Health Organization Global Salm-Surv network have reported that in the period of 2000 to 2002, *Salmonella enterica* serotype Enteritidis was by far the most common serotype reported from human sources worldwide, accounting for 65 % of the isolates (Herikstad et al., 2002; Galanis et al., 2006). *S. Enteritidis* accounted for 85% of all reported cases of human salmonellosis in Europe, but the incidence has declined from this peak (Fisher, 2001; Haeghebaert et al., 2002; Delmas et al., 2006). In United States, during 1998--2002, a total of 6,647 outbreaks of foodborne disease were reported. Among 2,167 (33%) outbreaks which the etiologic agent was determined, *S. Enteritidis* accounted for the largest number of outbreaks (Lynch et al., 2006).

Several studies have demonstrated that *S. Enteritidis* was the predominant *Salmonella* serovar in foodborne outbreaks occurred in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil (Geimba et al., 2004, Oliveira et al., 2005; Vaz et al., 2007; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2009). Further studies have demonstrated that a specific strain of *S. Enteritidis* was isolated from foods involved with salmonellosis

outbreaks occurred between 1999 and 2002, in RS, a 10.7 million people State (Oliveira et al., 2007, Oliveira et al., 2009). The same authors have reported that the *S. Enteritidis* strain isolated from foods responsible for salmonellosis presented the same PFGE and PCR-ribotyping profiles, however there is no study characterizing and comparing the food sample strains with the microorganisms isolated from salmonellosis victims.

Based on this, the objective of the present study was to characterize, by genotypic methods and antibiotic susceptibility testing, *S. Enteritidis* isolated from human samples, possibiliting the comparison with food sample strains.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

S. Enteritidis were isolated from human fecal and blood samples by the Central Laboratory of RS (FEPPS/LACEN/RS). Specimens were conducted to FEPPS/LACEN/RS after salmonellosis foodborne investigation carried out by Sanitary Surveillance Service of RS. A group of 80 *S. Enteritidis* was composed by randomly chosen isolates collected in RS during salmonellosis outbreaks. The 80 *S. Enteritidis* group was composed by 10 isolates sampled per year in a period comprised between 1999 and 2006. All isolates were identified in FEPPS/LACEN/RS, according to the FDA method, and were serotyped using the Kauffmann - White scheme, in the Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil.

One strain from food (mayonnaise potato salad) previously characterized by Oliveira et al. (2009) was compared with human isolates in PFGE typing.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial susceptibility was determined by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar (Difco Laboratories, Detroit, USA), following the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2005). The following antimicrobial disks and concentrations were used (Cefar Diagnóstica, São Paulo, Brazil): ampicillin (10 µg), tetracycline (30 µg), neomycin (10 µg), kanamycin (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (25 µg), gentamicin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), streptomycin (10 µg), nalidixic acid (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), sulphadiazine/trimethoprim (25 µg).

The testing was conducted and evaluated according to the document M100-S15 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). *Escherichia coli* ATCC 25922 was used for quality control testing

Molecular typing

PCR-ribotyping

The primers used have been previously proposed by Jensen, Webster, and Straus (1993) and were specific for the amplification of the spacer region between 16S and 23S rRNA genes. Primer sequences were 5' CAA GGC ATC CAC CGT GT3' and 5' GTG AAG TCG TAA CAA GG3' . Each set of PCRs included a control reaction without template DNA. Every reaction in 25 μ l contained 2.5 μ l of reaction buffer (100 mmol l⁻¹ Tris-HCl pH 8.8, 750 mmol l⁻¹ KCl), 2 μ l of 10 mmol l⁻¹ dNTPs, 1 μ l of 50 mmol l⁻¹ MgCl₂, 2 μ l of each primer (20 pmol), 1 U of Taq DNA Polymerase (Biotools, Madrid, Spain), 13.5 μ l sterile ultrapure water, and 2 μ l of DNA extracted for boiling.

The PCR-ribotyping program consisted of a preincubation cycle at 94 °C for 2 min, followed by 25 cycles of 94°C for 15 s, 55 °C for 4 min and 72 °C for 1 min, and a final extension step at 72 °C for 30 min. All PCRs were performed in a Minicycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) and the amplification products were separated by horizontal electrophoresis through 1% agarose gels. The gels were stained with ethidium bromide and visualized under UV light. DNA samples were tested three or more times to evaluate the reproducibility of the method.

Minor differences in band intensity as well as weak bands were not considered to define PCR-ribotypes. Isolates were ascribed to the same PCR-ribotype when their DNA amplified banding patterns were identical.

Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

The methods described previously for bacterial human isolates were used (Pang et al., 2005; Tsen and Lin, 2001). Briefly, *Salmonella* cells in 0.1 ml of the cell culture grown in 5 ml of LB broth at 37°C for 3.5h were pelleted, washed, resuspended in the same buffer, heated, and mixed with 2% agarose in lysozyme buffer. The mixture was poured into the slots of a plastic mold (Bio-Rad CHEF DRII,

Hercules, CA, USA), cooled, and the agarose plugs were transferred to lysozyme solutions containing 2mgml⁻¹ of lysozyme and cellswere lysed for 24 h. The lysis buffer was then replaced by a proteolysis buffer containing 0.1 mgml⁻¹ proteinase K and proteolysis was carried out overnight.

Afterwards, the agarose plugs were washed, followed by restriction digestion with *Xba*I (Invitrogen). After digestion, the plugs were placed into the slots of a 1.2% agarose gel (Bio-Rad, Pulsed field grade) in 0.5x TBE buffer (1x TBE: 89 mM Trisborate, pH 8.3, 2 mM EDTA) and electrophoresis was carried out using CHEF DRII PFGE system (Bio-Rad). The conditions used were 6 V/cm for 18 h at 14°C with pulsed time ranging from 3 to 63 seg.

The *Xba*I fragments of *S. enterica* ser. Typhimurium LT2 were used as molecular weight markers (Liu et al., 1993). The gels were stained with ethidium bromide and photographed. For some strains, PFGE analysis was repeated if the gel patterns were unclear. In addition, for each PFGE pattern, at least one randomly selected isolate was re-typed for the reproducibility of the result in each PFGE batch. PFGE patterns obtained were analyzed by visual assessment.

Differences in patterns were judged according to the method described by Thong et al. (1995), Laconcha et al. (1998) and Fernandez et al. (2003). Patterns differing by one band were considered as distinct PFGE patterns.

Results and discussion

In the present study, 21 resistance profiles were described (Table 1) among the 80 *S. Enteritidis* investigated, and only three isolates (3.75%) were susceptible to all the antibiotics tested. The most frequent resistance pattern was represented by the single resistance to ampicillin (37.5%), followed by the resistance to ampicillin and nalidixic acid (18.75%). The Table 2 presents the general percentages of antimicrobial resistance among *S. Enteritidis* studied. The major resistances were observed for ampicillin (81.25%), streptomycin (18.75%), and nalidixic acid (25%).

In Brazil, epidemiological data demonstrate that *S. Enteritidis* as the main cause of foodborne diseases in different States and strains presenting antimicrobial resistance have been identified (Tavecchio et al., 1996; Geimba et al., 2005, Oliveira et al, 2006). Previous studies revealed a significant increase in resistance to ampicillin (from 3.6% to 100%) and to nalidixic acid (from 9.1% to 66.7%) among *S.*

Enteritidis isolated from foods involved with salmonellosis occurred in 1999 to 2006 (Geimba et al., 2005; Oliveira et al., 2006, de Paula, 2006).

Salmonella resistant to nalidixic acid have been reported in other countries and seem to be a subject of concern. According Threlfall et al. (2006), by far the most dramatic increase in the incidence of resistance has been observed in *S. Enteritidis*, in England and Wales, where the occurrence of strains with resistance to nalidixic acid has more than doubled (from 11% to 26%) between 2000 and 2004. Recently, the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2004) added a guideline recommending clinical laboratories to routinely test for nalidixic acid resistance in extraintestinal *Salmonella* isolates to alert physicians of the emerging resistance.

Resistance to nalidixic acid has been suggested to be an indicator of the fluoroquinolone resistance, which is used to treat salmonellosis in humans (Crump et al., 2003; Hakanen et al., 1999; Vasallo et al., 1998; Gorman & Adley, 2004). Therefore, nalidixic acid resistance has been associated with a decrease in susceptibility to fluoroquinolones. In Brazil, enrofloxacin is commonly used in veterinary practices and this could explain the resistance of *S. Enteritidis* to nalidixic acid.

Resistance to the other antimicrobials such as ampicillin, streptomycin, tetracycline, and gentamicin were also observed among the isolates studied by us. High levels of ampicillin resistance among *S. Enteritidis* isolated from humans, animals and foods were reported by different researchers (Breuil et al., 2000; Cruchaga et al., 2001).

Tetracycline resistance was observed among *S. Enteritidis* (12.5%) investigated in this study. Similar results were reported by several other studies (Lee et al., 1993; Tessi et al., 1997; Manie et al., 1998; Hernandez et al., 2002; Usera et al., 2002; Nayak et al., 2004). Tetracycline and streptomycin are common antimicrobials administered in veterinary medicine their frequent use may have contributed to the resistance rates found. On other hand, chloramphenicol resistance was observed among *S. Enteritidis* investigated by us, however animal feed probably was not the responsible cause, once chloramphenicol was banned from animal production in Brazil more than a decade ago. Since resistance genes in distinct clusters or antimicrobial resistance islands is now regarded as an efficient means by which the dissemination of these markers can occur en bloc, and numerous reports have demonstrated that some *Salmonella* isolates carry plasmid with the *bla*_{CMY} gene

cassette that contains integrons that carry the genes encoding for resistance to ampicillin, chloramphenicol, sulphamethoxazole, tetracycline, and streptomycin (Fluit and Schmitz, 1999; Briggs and Fratamico, 1999; Rankin et al., 2002).

Multi-resistant strains of *Salmonella* have been found in different parts of the world, and this may indicate the spread of multi-resistant clones, which might have a greater potential for infections and for the development of additional resistance to new antibiotics (Cruchaga *et al.*, 2001). In this study, the overall incidence of resistance (to at least one antimicrobial) was observed in 77 isolates (96.25%). Multi-resistance, considering by us the resistance to two or more antimicrobials, occurred in 41 (51.25%) of the isolates.

The appearance of multi-resistance in foodborne and clinical human *Salmonella* isolates is a problem of major concern for public health and suggests the need of a continuous surveillance and of a more prudent use of antibiotics by feed industries, farmers, veterinarians, and physicians. Prevention strategies are needed, as well as, molecular epidemiological studies that characterize the prevalent strains (Baggesen et al., 2000).

The vast majority of human *Salmonella* infections are attributed to foodborne transmission, and studies have found resistant *Salmonella* isolated from food, animals, and humans (Boonmar et al., 1998; Hanson et al., 2002). However, there is limited information about the comparison of *Salmonella* isolated from food and those isolated from humans.

In this study, we demonstrated the widespread occurrence of resistant *S. Enteritidis* strains isolated from humans involved in salmonellosis outbreaks. This finding is in accordance with previous studies of *Salmonella* strains isolated from foods involved in foodborne outbreaks in RS, in the same period (Geimba et al., 2005; Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2007).

Molecular characterization by PCR-ribotyping of the 80 human isolates identified three profiles, presenting 2 to 4 DNA fragments. The predominant profile (R1) displayed four bands and grouped 47.5% of the isolates (Fig. 1). The other two profiles (R2 and R3) grouped 33.5% and 19%, respectively. PFGE characterization identified also three profiles, displaying 10 to 13 bands (Fig. 2). The majority of the isolates shared the same pattern denominated P1 (96.25%). Pattern P2 was found in two strains and P3 was found in only one strain. A predominant PFGE pattern has

also been found in others studies on *S. Enteritidis* isolates (Liebana et al., 2001, 2002; Kalender et al., 2009).

PCR-ribotyping was able to further subdivide the PFGE profiles, since among 38 strains grouped in R1, 97.4% (n = 37), among 27 strains classified as R2, 92.6% (n=25), and all strains grouped in R3 profile (n=15) were also classified as P1, suggesting a clonal relationship among the majority of the *S. Enteritidis* analyzed. This supports the use of PCR-ribotyping as a valuable tool for epidemiological characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates.

PCR-Ribotyping and PFGE profiles of human *S. Enteritidis* analysed in this study were compared with *S. Enteritidis* isolated from foods studied by Geimba et al. (2004) and Oliveira et al. (2007; 2009). All Isolates were analysed by the same protocols and were collected at the same period onwards in the same Brazilian State, allowing the comparison. The predominant patterns obtained by PCR-Ribotyping and PFGE from human strains were identical to the predominant patterns obtained from food strains, also suggesting a clonal relationship among the microorganisms. Analysis of the human and food strains from the same area indicates the spread of certain genetically identical or similar clones of *S. Enteritidis* in human and foods. However, it is interesting to investigate the clonal similarity between human and food strains is simply due to the limited clonal diversity of *S. Enteritidis* strains or it is due to the spreading of a specific strain.

The use of PCR-ribotyping and PFGE in the present study revealed the following findings: *S. Enteritidis* generated identical or closely related profiles by both techniques. The advantages in terms of turnaround, ease of use and equipment cost suggest that PCR-ribotyping could be an attractive alternative to PFGE, mainly for epidemiological investigation of foodborne outbreaks and especially when real-time results may contribute to supporting timely control measures. An association with PFGE or other molecular methods could also be recommended in order to achieve fine subtyping in highly homogeneous serotypes such as *S. Enteritidis*.

The results of epidemiological investigations of salmonellosis occurred in RS, others Brazilian States, and other regions of the world strongly support that *S. Enteritidis* is one of the major cause of foodborne infection to humans and highlights the potential hazard to public health (Kuhn et al., 1995, Geimba et al., 2004; Oliveira et al, 2005; Oliveira et al., 2009).

In conclusion, our results demonstrated the widespread occurrence of resistant *S. Enteritidis* strains isolated from humans involved in salmonellosis outbreaks. The most frequent resistance pattern was the single resistance to ampicillin, followed by the resistance to ampicillin and nalidixic acid. In addition, we emphasize the clonal correlation between human and food samples of *S. Enteritidis* strains involved with salmonellosis outbreaks in RS State.

TABLE 1. Antimicrobial resistance, PCR-ribotyping and PFGE profiles of *S. Enteritidis* isolated from human samples involved in salmonellosis outbreaks occurred in Southern Brazil (1999 to 2006).

<i>Antimicrobial profile</i>	<i>PCR-ribotyping profile</i>	<i>PFGE Profile</i>	<i>Number of isolates</i>
AMP	R1	P1	30
NAL	R1	P1	5
GEN	R1	P1	1
AMP, SXT	R1	P1	1
AMP, S	R2	P1	5
AMP, NAL	R3	P1	15
AMP, GEN	R1	P2	1
AMP, T	R2	P3	1
AMP, SZT	R2	P1	1
AMP, NAL, GEN	R2	P2	1
AMP, NAL, CIP	R2	P1	3
AMP, NAL, T	R2	P1	2
AMP, NAL, NEO	R2	P1	1
AMP, SXT, T	R2	P1	1
AMP, S, T	R2	P1	1
AMP, S, GEN	R2	P1	3
AMP, S, T, GEN, NAL	R2	P1	1
AMP, S, T, SXT, C, SZT	R2	P1	1
AMP, S, TET, SXT, NEO, SZT	R2	P1	1
AMP, S, T, GEN, SXT, NEO, K	R2	P1	1
AMP, S, T, SXT, NEO, C, GEN, SZT	R2	P1	1
susceptible to all the antibiotics tested	R2	P1	3

ampicillin (AMP); tetracycline (T); neomycin (NEO); kanamycin (K); sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT); gentamicin (GEN); chloramphenicol (C); streptomycin (S); nalidixic acid (NAL); ciprofloxacin (CIP), Sulfadiazine/trimethoprim (SZT).

TABLE 2: General percentages of antimicrobial resistance among *S. Enteritidis* isolated from human samples involved in foodborne outbreaks occurred in Southern Brazil (1999 to 2006).

<i>Antimicrobial resistance (%)</i>											
	AMP	T	NE	K	SXT	GEN	C	S	NAL	SZT	CIP
Sensitive	18.75	81.25	70	97.5	90	86.25	95	77.5	67.5	93.75	95
Intermediate	0	6.25	25	1.25	2.5	1.25	2.5	3.75	7.5	0	1.25
Resistant	81.25	12.5	5	1.25	7.5	12.5	2.5	18.75	25	6.25	3.75

ampicillin (AMP); tetracycline (T); neomycin (NEO); kanamycin (K); sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT); gentamicin (GEN); chloramphenicol (C); streptomycin (S); nalidixic acid (NAL); ciprofloxacin (CIP), Sulfadiazine/trimethoprim (SZT).

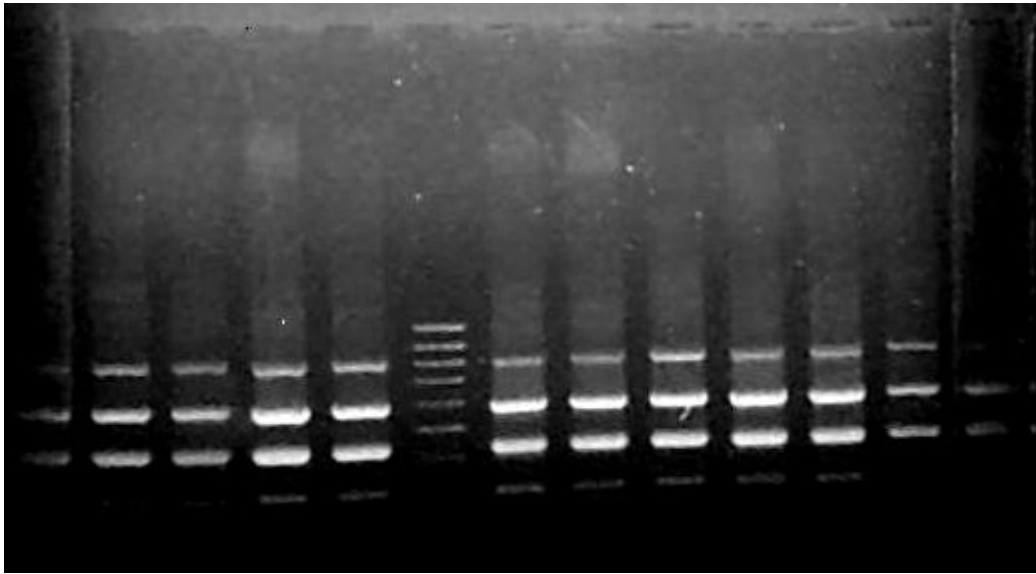


Figure 1. PCR-ribotyping profiles of *S. Enteritidis* isolated from humans involved in foodborne outbreaks occurred in Rio Grande do Sul State, South of Brazil, during the years 1999 to 2006. Lane M: molecular size marker (100bp DNA ladder, Invitrogen).

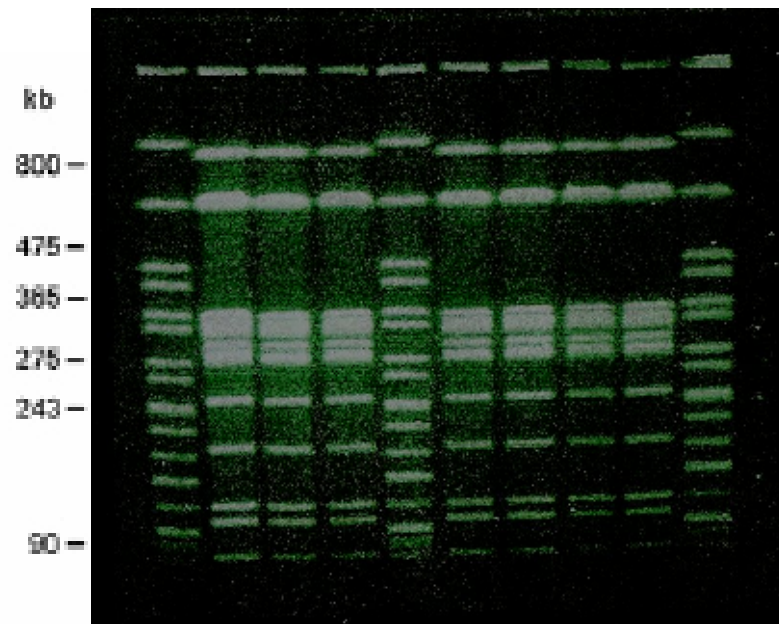


Figure 2. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) patterns for *XbaI*-digested genomic DNA of *Salmonella* Enteritidis strains from humans. Lanes 1, 5 and 10 contains *XbaI*-digested DNA of *S. Typhimurium* LT2. Lanes 3,4,6,7,8 and 9, *S. Enteritidis* strains from humans. Lane 2 contain *S. Enteritidis* strains from mayonnaise potato salad.

References

- Baggesen DL, Sandvang D and Aarestrup FM. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and United States. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 1581-1586.
- Bessa MC, Michael GB, Canu N, Canal CW, Cardoso M, Rabsch W, Rubino S. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. *Research in Veterinary Science* 2007; 83: 302–310.
- Biendo M, Laurans G, Thomas D, Canarelli B, Hamdad-Daoudi F, Rousseau F, Castelain S. Molecular characterization and mechanisms of resistance of multidrug-resistant human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Amiens (France). *International Journal of Antimicrobial Agents* 2005; 26: 219–229.
- Breuil J, Brisabois A, Casin I, Armand-Lefèvre L, Frémy S, Collatz E. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2000; 46: 965-971.
- Briggs CE, Fratamico PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1999; 37: 846-849.
- Brisabois A, Cazin I, Breuil J, Collatz E. Surveillance of antibiotic resistant *Salmonella*. *Eurosurveillance* 1997; 2:19-20.
- Carramiñana JJ, Rota C, Agustín I, Herrera A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Veterinary Microbiology* 2004; 104: 133-139.
- Cerro A, Soto SM, Mendoza MC. Virulence and antimicrobial-resistance genes profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. *Food Microbiology* 2003; 20: 431-438.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). (2005). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test (8th ed.). Wayne, PA, USA Approved standard M2-A8, CLSI/NCCLS.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). (2004). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: (14th ed.). Informational supplement. NCCLS document M100 S14 (ISBN 1 56238 516 X). Wayne, PA. USA, CLSI/NCCLS.
- Cruchaga S, Echeita A, Aladueña A, García-Peña J, Frias N, Usera MA. Antimicrobial resistance in *salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2001; 47: 315-321.
- Crump JA, Barrett TJ, Nelson JT, Angulo FJ. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype Typhi and for non-typhi *salmonellae*. *Clinical Infectious Diseases* 2003; 37: 75–81.
- Delmas G, Gallay A, Espié E, Haeghebaert S, Pihier N, Weill FX, De Valk H, Vaillant V, Désenclos JC. Les Toxiinfections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire* 2006; 51–52: 418–422.
- Fernandez J, Fica A, Ebensperger G *et al.* Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41:1617-1622.
- Food and Drug Administration. *Bacteriological Analytical Manual*, 7th Ed. AOAC International, Arlington, 1992.
- Fluit AC, Schmitz FJ. Class I integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur Journal Clinical Microbiological Infectious Diseases* 1999; 18: 761-770.
- Galanis E, Wong DMA, Patrick ME, Binsztein N, Cieslik A, Chalermchaikit T, Aidara-Kane A, Ellis A, Angulo FJ, Wegener HC. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000 to 2002. *Emerging Infectious Diseases* 2006; 12: 381- 388.
- Gatto AJ, Peters TM, Green J, Fisher IS, Gill ON, O'brien SJ, Maguire C, Berghold C, Lederer I, Gerner-Smidt P, Torpdahl M, Siitonen A, Lukinmaa S, Tschape H, Prager R, Luzzi I, Dionisi AM, Vander Zwaluw, WK, Heck M, Coia J, Brown D, Usera M, Echeita A, Threlfall EJ. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000–2004: results of an international multi-centre study. *Epidemiol. Infect.* 2006;134:729–736.

- Geimba MP, Tondo EC, Brandelli A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks that occurred in the south of Brazil, 1999–2000 Journal of Food Safety 2005; 25:173-182.
- Geimba MP, Tondo EC, Oliveira FA, Canal CW., Brandelli A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. Journal of Food Protection 2004; 67: 1229-1233.
- Gorman R and Adley C. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food and animal sources in the Republic of Ireland. Journal of Clinical Microbiology 2004; 42: 2314–2316.
- Gudmundsdottir S, Hardardottir H, Gunnarson E. Subtyping of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium outbreak strains isolated from humans and animals in Iceland, Journal of Clinical Microbiology 2003; 23: 4833–4835.
- Haeghebaert S, Le Querrec F, Bouvet P, Gallay A, Espié E, Vaillant V. Les toxiinfections alimentaires collectives en France en 2001. Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire 2002; 50: 249–254.
- Hakanen A, Siitonenb A, Kotilainenc P, Huovinenena P. Increasing fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serotypes in Finland during 1995–1997. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 1999; 43: 145–148.
- Hanson ND, Moland ES, Hossain A, Neville SA, Gosbell IB, Thomson KS. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 h-lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2002; 49: 1011 – 1014.
- Heinitz ML, Ruble RD, Wagner DE, Tatini SR. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. Journal of Food Protection 2000; 63:579-592.
- Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping, Epidemiology and Infection 2002; 129: 1- 8.
- Hernández T, Rodruiguez-Alavarez C, Arévalo MP, Torres A, Sierra A, Arias A. Antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from chickens in Spain. Journal of Chemotherapy 2002; 14: 346-350.
- Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. Applied and Environmental Microbiology 1993; 59: 945-952.

- Kalender H, Sen S, Hasman H, Hendriksen RS, Aaestrup FM. Antimicrobial Susceptibilities, Phage Types, and Molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from chickens and chicken meat in Turkey. *Foodborne Pathogens and Disease* 2009; 6:265-271.
- Kauffma NF. Kauffmann-White Schema. In: *Serological diagnosis of Salmonella species*. Copenhagen: Munksgaard, 1972. p.59-123.
- Kostman JR, Edlind TD, LiPuma JJ, Stull TL. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. *Journal Clinical Microbiology* 1992; 30:2084-2087.
- Kuhn H. Epidemiology of salmonellosis in Germany. *Biotest Bulletin* 1995;.5: 157-170.
- Laconcha I, López-Molina N, Rementeria A, Audicana A, Perales I, Garaizar J. 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* 1998; 40: 27–34.
- Lee AL, Threatt VL, Puhr ND, Levine P, Ferris K, Tauxe RV. Antimicrobial resistant *Salmonella* spp isolated from healthy broiler chickens after slaughter. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1993; 202: 752-755.
- Liebana E, Garcia-Migura L, Guard-Petter J, McDowell SW, Rankin S, Opitz HM, Clifton-Hadley FA, Davies RH. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage-types 4,6–8, 13a, 29 and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 92: 196–209.
- Liebana E, Garcia-Migura L, Breslin M F, Davies R H, Woodward MJ. Diversity of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 154-161.
- Liebisch B and Schwarz S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. *Journal of Medical Microbiology* 1996; 44: 52-59.
- Ling ML and Wang GCY. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates in Singapore. *The Journal of Infection* 2001; 43:169-72.

- Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. The *Xba*I–*Bln*I–*Ceu*I genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2 determined by double digestion, end labelling and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Bacteriology* 1993; 175: 4104–4120.
- Lynch M, Painter J, Woodruff R, Braden C. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 1998–2002. 2006; 10: 1-34
- Manie T, Khan S, Brozel VS, Veith WJ, Gouws PA. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in Soth Africa. *Letters in Applied Microbiology* 1998; 26: 253-258.
- Millemann Y, Lesage-Descauses MC, Lafont JP, Chaslus-Dancla E. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 1996; 14: 129-134.
- Nayak R, Stewart T, Wang RF, Lin J, Cerniglia CE, Kenney PB. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic –resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *International Journal of Food Microbiology* 2004; 91: 51-62.
- Oliveira F A, Geimba MP, Pasqualotto AP, Brandelli A, Pasquali G, Silva WP, Tondo EC. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. *Food Control* 2009; 20: 606-610.
- Oliveira FA, Frazzon APG, Brandelli A, Tondo EC. Use of PCR-Ribotyping, RAPD, and Antimicrobial Resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. *Journal of Infection in developing countries* 2007; 1: 170-176.
- Oliveira FA, Brandelli A, Tondo EC. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *The New Microbiologica* 2006; 29:49-54.
- Oliveira SD, Flores FS, 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* 2005; 97: 297–305.
- Padungtod P and Kaneene JB. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 2006;108:346–354.

- Popoff M Y, Bockemühl J, Gheesling LL Supplement 2001 (n°.45) to the Kauffmann-White scheme. *Research in Microbiology* 2003; 154:173-174.
- Prieto RG, Alejandre CG; Meca AA., Barrera VH., de Miguel AG. Epidemiology of hospital-treated *Salmonella* infection; Data from a national cohort over a ten-year period. *Journal of Infection* 2009; 58:175-181.
- Rabsch W, Tschape H and Baumler AJ. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. *Microbes and Infection* 2001; 3: 237-247.
- Rankin SC, Aceto H, Cassidy J, Holt J, Young S, Love B, Tewari D, Munro DS, Benson CE. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 40: 4679-4684.
- Schwarz S and Liebisch B. Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. *Letters in Applied Microbiology* 1994; 19: 469–472.
- Soto SM, Guerra B, Del Cerro A, González-Hevia MA and Mendoza MC. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. *Int. J. Food Microbiol.* 2001; 71: 45–53.
- Stevens A, Kerouanton A, Marault A, Millemann Y, Brisabois A, Cavin JF and Dufour B. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 123:191-197
- Swaminathan B, Barret TJ, Hunter SB, Tauxe RV. PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7: 382-389.
- Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella Enteritidis* in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical* 1996; 38: 315-322.
- Tessi MA, Salsi M, CafferM, Moguilevski M.A. Drug resistance of Enterobacteriaceae isolated from chicken carcasses. *Journal of Food Protection* 1997; 60: 1001-1005.
- Thong KL, Ngeow YF, Altwegg M, Navaratnam P, Pank T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* pulsed field gel electrophoresis and ribotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 1070–1074.

- Threlfall EJ, Day M, Pinna E, Charlett A, Goodyear KL. Assessment of factors contributing to changes in the incidence of antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium from humans in England and Wales in 2000, 2002 and 2004. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2006; 28: 389–395.
- Tsen HY, Hu HH, Lin JS, Hung SH and Wang TK. Analysis of the *Salmonella typhimurium* isolates from food-poisoning cases by molecular subtyping methods. *Food Microbiol.* 2000; 17: 143–152.
- Usera MA, Aladueña A, González R, de La Fuente M, García-Peña J, Frías N, Echeita MA. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. From animals sources in Spain in 1996 and 2000. *Journal of Food Protection* 2002; 65: 768-773.
- Vasallo FJ, Martin-Rabadan P, Alcalá L, García-Lechuz JM, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. Failure of ciprofloxacin therapy for invasive nontyphoidal salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases* 1998; 26: 535-536.
- Vaz, C S L; Streck AF, Tramontina T, Cardoso MRI, Canal CW. Use of a modified AFLP protocol to discriminate *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Enteritidis isolates. *Acta Scientiae Veterinariae* (Online) 2007; 35: 41-48.

6 Conclusões

Há ocorrência de resistência e multi-resistência a antimicrobianos, principalmente à ampicilina e ao ácido nalidíxico, tanto em cepas de *S. Enteritidis* isoladas de humanos quanto de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose.

Não foi possível correlacionar os perfis de PCR-ribotipificação e de PFGE com os perfis de resistência a antimicrobianos, contudo, entre os diferentes genótipos identificados, um foi predominante, sendo composto por cepas isoladas de alimentos e de humanos.

Cepas de *S. Enteritidis* pertencentes aos perfis P1 e R1, para PFGE e PCR-ribotipificação, respectivamente, foram prevalentes em alimentos e em material clínico humano e foram, provavelmente, responsáveis pelos casos e surtos de salmonelose de origem alimentar ocorridos no RS no período de 1999 a 2006.

A técnica PCR-ribotipificação representa uma ferramenta útil para a tipificação epidemiológica de *S. Enteritidis*, tendo apresentado capacidade discriminatória semelhante a da técnica de PFGE.

As técnicas moleculares utilizadas indicam similaridade genética entre as cepas isoladas de alimentos e de humanos, sugerindo relação clonal entre as cepas envolvidas em surtos no período de 1999 a 2006 e impedindo a identificação da origem da contaminação.

Referências Bibliográfica

AKIBA, M.; UCHIDA, I.; NISHIMORI, K.; TANAKA, K.; ANZAI, T.; KUWAMOTO, Y.; WADA, R.; OHYA, T.; ITO, H. Comparison of *Salmonella enterica* serovar Abortusequi isolates of equine origin by pulsed-field gel electrophoresis and fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting. **Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 379-388, 2003.

ALMEIDA, I.A.Z.C. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 _ 1999. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.59, p. 33-37, 2000.

AMAVISIT, P.; LIGHTFOOT, D.; BROWNING, G.F.; MARKHAM, P.F. Variation between pathogenic serovars within *Salmonella* pathogenicity islands. **Journal of Bacteriology**, v. 185, p. 3624–3635, 2003.

ARBEIT, R. D. Laboratory procedures for the epidemiology analysis of microorganisms. In: Arbeit, R. D. **Manual of Clinical Microbiology**, 7 ed., 2001.p. 116-137.

ASSEVA, P.P.; IVANOV, I.; KANTARDJIEV, T. Surveillance of Human Salmonellosis in Bulgaria, 1999-2004: Trends, shifts and resistance to antimicrobial agents, **Eurosurveillance**, v.11, n.4-6, 2006.

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**, v. 74, p. 243-247, 2000.

BAGGESEN, D.L.; SANDVANG, D.; AARESTRUP, F.M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and comparison with isolates from Europe and United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 1581-1586, 2000.

BAGGESEN, D.L., SORENSEN, L.L., KRAUSER, M., et al. The occurrence of *Salmonella enterica* serotypes in animal feed, pig, pork and man. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *Salmonella* IN PORK, 2, 1997, Copenhagen. **Anais...Copenhagen** : [S.n], 1997. p.56 59.

BAGER, F.; HELMUTH, R. Epidemiology of resistance to quinolones in *Salmonella*. **Veterinary Research**, v..32, p. 285–290, 2001.

BAKERI, S.A.; YASIN, R.M.; KOH, Y.T.; PUTHUCHEARY, S.D.; THONG, K.L. Genetic diversity of human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in Malaysia. **Journal of Applied Microbiology**, v.95, n.4, p. 773–780, 2003.

BANWART, G. J. **Basic Food Microbiology**. 2 Ed., Van Nostrand Reinhold, New York, 1989.

BAUDART, J.; LEMARCHAND, K.; BRISABOIS, A.; LEBARON, P. 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**, v.66, p.1544-1552, 2000.

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

BELTRAN, P., MUSSER, J.M., HELMUTH, R., FARMER, J.J., FRERICHS, W.M., WACHSMUTH, I.K., FERRIS, K., MCWHORTER, A.C., WELLS, J.G., CRAVIOTO, A. Toward a population genetic analysis of *Salmonella*: genetic diversity and relationships among strains of serotypes *S. choleraesuis*, *S. derby*, *S. dublin*, *S. enteritidis*, *S. heidelberg*, *S. infantis*, *S. newport*, and *S. typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.85, 7753–7757, 1988.

BEN-BARAK, Z.; STECKEL, W.; YARON, S.; COHEN, S.; PRAGER, R.; TSCHAPPE, H. The expression of the virulence-associated effector protein gene *avrA* is dependent on a *Salmonella enterica*-specific regulatory function. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 296, p. 25–38, 2006.

BENDER, J. B.; HEDBERG, C.W.; BOXRUD, D.J.; BESSER, J.M.; WICKLUND, J.H.; SMITH, K.E.; OSTERHOLM, M.T. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, p. 345-350, 2001.

BENNASAR, A.; LUNA, G.; CABRER, B.; LALUCAT, J. Rapid identification of *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis* and *S. virchow* isolates by polymerase chain reaction based fingerprinting methods. **International Microbiology**, v.3, p. 31-38, 2000.

BERCHIERI, A.; PAULILLO, A. C. *Salmonella* em um Abatedouro Avícola. **Ars Veterinária**, v.3, p. 81-87, 1995.

BETANCOR, L.; SCHELOTTO, F.; MARTINEZ, A.; PEREIRA, M.; ALGORTA, G.; RODRÍGUEZ, M. A.; VIGNOLI, R.; CHABALGOITY, J.A. Random amplified polymorphic DNA and phenotyping analysis of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates collected from humans and poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.1155-1162, 2004.

BESSA, M.C.; MICHAEL, G.B.; CANU, N., CANAL, C.W.; CARDOSO, M.; RABSCH, W.; RUBINO, S. Phenotypic and genetic characterization of *Salmonella*

enterica subsp. enterica serovar Typhimurium isolated from pigs in Rio Grande do Sul, Brazil. **Research in Veterinary Science**, v. 83, p. 302–310, 2007.

BESSA, M.C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos sob inspeção federal no Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.24, p.80–84, 2004.

BEYER, W.; MUKENDI, F. M.; KIMMIG, P.; BÖHM, R. Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p.1549–1554, 1998.

BIEDENBACH, D.J.; TOLEMAN, M.; WALSH, T. R.; JONES, R.N. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones isolated in North America and Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, p. 13–21, 2006.

BIENDO, M.; LAURANS, G.; THOMAS, D.; CANARELLI, B.; HAMDAD-DAOUDI, F.; ROUSSEAU, F.; CASTELAIN, S. Molecular characterisation and mechanisms of resistance of multidrug-resistant human *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated in Amiens (France). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 219–229, 2005.

BOONMAR, S.; BANGTRAKULNOTH, A.; PORNRUNANGWONG, S.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H.; KANEKO, K.I.; OGAWA, M. Epidemiology analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from human and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, N.4, p. 971–974, 1998.

BOOP, C. A.; BRENNER F.W.; WELLS J.G.; STROCKBINE, N.A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella. Escherichia, Shigella and Salmonella. Manual of clinical Microbiology*, 7th ed. , Washington, DC: ASM Press, p. 467, 1999.

BOROWSKY, L.M.; BESSA, M.C.;CARDOSO, M.I.; AVANCINI, C.A.M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**, v.36, p.1474-1479, 2006.

BOUVET, P. J. M., FOUGERAT, I., GUESNIER, F., GUIBERT, F., K'OUAS, G., LENORMAND, P., METZ, L., RUCKLY, C.; GRIMONT, P.A.D. Human salmonellosis surveillance in France: recent data from the National Reference Center, p. 411-416. In P. Colin and G. Clément (ed.), Proceedings of the **International Symposium Salmonella & Salmonellosis**. AFSSA/INRA/InVS/Institut Pasteur/ISPAIA, St. Brieue, France, 2002.

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.

BRENNER, F. W.; MCWHORTER-MURLIN, A. C.. Identification and serotyping of *Salmonella*. **Centers for Disease Control and Prevention**, Atlanta, Ga, 1998.

BREUIL, J.; BRISABOIS, A.; CASIN, I.; ARMAND-LEFÈVRE, L.; FRÉMY, S.; COLLATZ, E. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 965-971, 2000.

BRIGGS, C.E.; FRATAMICO, P.M. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 37, p. 846-849, 1999.

BRISABOIS, A.; CAZIN, I.; BREUIL, J.; COLLATZ, E. Surveillance of antibiotic resistant *Salmonella*. **Eurosurveillance**, v.2, n. 3, p.19-20, 1997.

BRUSSOW, H.; CANCHAYA, C.; HARDT, W.D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.68, p.560–602, 2004.

BURR, M.D.; JOSEPHSON, K.L.; PEPPER, I.L. An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p.24–30, 1998.

BUTAYE, P.; MICHAEL, G.B.; SCHWARZ, S.; BARRETT, T.J.; BRISABOIS, A.; WHITE, D.G. The clonal spread of multidrug – resistant non-typhi *Salmonella* serotypes. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1891-1897, 2006.

CAPRIOLI, A.; BUSANI, L.; MARTEL, J.L.; HELMUTH, R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiology and microbiological methodologies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.295-301, 2000.

CARBALLO, J.; FERREIROS, C.M.; CRIADO, M.T. Factor analysis in the evaluation of the relationship between bacterial adherence to biomaterials and changes in free energy. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 7, n.2, p. 130-141. 1992.

CARRAMIÑANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTÍN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, v.104, p.133-139, 2004.

CASARIN, L.S.; KLEIN, M. P.; BRANDELLI, A.; TONDO, E. C. Survival of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis in frozen chicken hamburger. **Journal of Muscle Foods**, 2009 *in press*.

CASTAGNA, S.M.F.;SCHWARZ, P.; CANAL, C.W.; CARDOSO, M. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p.141–147, 2004.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Foodborne outbreak response and surveillance unit**. U.S. Foodborne disease outbreaks. June, 2004b. Disponível em: http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/us_outb.htm. Acesso em: 20 nov. 2006.

CERRO A.; SOTO, S.M.; MENDOZA, M. C. Virulence and antimicrobial-resistance genes profiles determined by PCR-based procedures for *Salmonella* isolated from samples of animal origin. **Food Microbiology**, v. 20, p. 431-438, 2003.

CERRO, A.; SOTO, S. M.; LANDERAS, E. ; GONZALEZ-HEVIA, M. A.; GUIJARRO, J. A.; MENDOZA, M. C. PCR-based procedures in detection and DNA-fingerprinting of *Salmonella* from samples of animal origin. **Food Microbiology**, v.19, p.567-575, 2002.

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

CHIU, T.H.; CHEN, T.R.; HWANG, W.Z.; TSEN, H.Y. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S-23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. **International Journal Food Microbiology**, v. 97, p. 259-265, 2005.

CHRISTENSEN, H.; MOLLER, P.L.; VOGENSEN, F.K.; OLSEN, J.E. Sequence variation of the 16S to 23S rRNA spacer region in *Salmonella* enterica. **Research in Microbiology**, v. 151, p. 37-42, 2000.

CHMIELEWSKI, R.; WIELICZKO, A.; KUCZKOWSKI, M.; MAZURKIEWICZ, M.; UGORSKI, M. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella* Enteritidis isolates from Poland. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 49, 163-168, 2002.

CIMONS, M. Rapid food-borne pathogen ID system is making a difference. **ASM News**, v.66, p. 617-619, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI/NCCLS). (2005). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test (8th ed.). Wayne, PA, USA Approved standard M2-A8, CLSI/NCCLS.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI/NCCLS). (2004). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: (14th ed.). Informational supplement. NCCLS document M100 S14 (ISBN 1 56238 516 X). Wayne, PA. USA, CLSI/NCCLS.

CLIVER, D. O. **Foodborne disease**. London, Academic Press, 1990.

CONDON, C.; SQUIRES, C.; SQUIRES, C.L. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. **Microbiology Reviews**, v. 59, p. 623-645, 1995.

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

CRUCHAGA, S.; ECHEITA, A.; ALADUEÑA, A.; GARCÍA-PEÑA, J.; FRIAS, N.; USERA, M.A. Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, p. 315-321, 2001.

CRUMP, J.A.; BARRETT, T.J.; NELSON, J.T.; ANGULO, F.J. Reevaluating fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella enterica* serotype Typhi and for non-typhi *Salmonellae*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, p.75–81, 2003.

DARINI, A.L.; MAGALHÃES, V.D.; LEVY, C.L.; BARTH, A.L.; COSCINA, A.L. Phenotyping and genotyping methods applied to investigate the relatedness of Brazilian isolates of *Enterobacter cloacae*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.32, p. 1077-81, 1999.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. Molecular basis of the interactions of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Microbiology Reviews**. v. 12, n. 3, p. 405-428, 1999.

DAVIES, R.; BRESLIN, M. Effects of vaccination and other preventive methods for *Salmonella* Enteritidis on commercial laying chicken farms, **Veterinary Record**, v. 153, p. 673-677, 2003.

DE CESARE, A.; MANFREDI, G.; DAMBAUGH, T.R.; GUERZONI, M.E.; FRANCHINI, A. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strains isolated in Italy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 780-785, 2001.

DELMAS, G.; GALLAY, A.; ESPIÉ, E.; HAEGHEBAERT, S.; PIHIER, N.; WEILL, F.X.; DE VALK, H.; VAILLANT, V.; DÉSENCLOS, J.C. Les Toxiinfections alimentaires collectives en France entre 1996 et 2005. **Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire**, v. 51–52, p. 418–422, 2006.

DE PAULA, C.M.D. **Avaliação da sorologia e susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* sp. envolvidas em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul no período de janeiro de 2003 junho de 2006.** 2006. Monografia (Curso de Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2006.

DODD, C. E. R.; SHARMAN, R. L.; BLOOMFIELD, S. F.; BOOTH, I. R.; STEWART, G. S. A. Inimical processes: Bacterial self-destruction and sub-lethal injury. **Trends in Food Science & Technology**. v. 81, p.1997.

DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAGATOLLA, C.; PRANDIN, L.; MONTI-BRAGADIN, C. Identification of *Acinetobacter* isolates in the *A. calcoaceticus*-*A. baumannii* complex by restriction analysis of the 16S-23S rRNA intergenic spacer sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1108-1113, 1995.

DOYLE, E.M.; MAZZOTTA, A.S. Review of studies on the thermal resistance of *Salmonellae*. **Journal of Food Protection**, v.63, p.779-795, 2000.

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**, v. 205, p. 25-29, 2001.

EVEREST, P.; KETLEY, J.; HARDY, S.; DOUCE, G.; KHAN, S.; SHEA, J.; HOLDEN, D.; MASKELL, D.; DOUGAN, G. Evaluation of *Salmonella typhimurium* mutants in a model of experimental gastroenteritis. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 2815–2821, 1999.

FAHLEN, T.F.; MATHUR, N.; JONES, B.D. Identification and characterization of mutants with increased expression of *hilA*, the invasion gene transcriptional activator of *Salmonella* Typhimurium. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 28, p. 25–35, 2000.

FANG, F.C., DEGROOTE, M.A., FOSTER, J.W., BAÜMLER, A.J., OCHSNER U., TESTERMAN, T., BEARSON, S., GIA ' RD, J.C., XU, Y., CAMPBELL, G. LAESSIG, T. Virulent *Salmonella typhimurium* has two periplasmic Cu,Zn-superoxide dismutases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 7502–7507, 1999.

FERNANDES, S.A.; GHILARD, A.C.R.; TAVECHIO, A.T.; FIORI, V.; SANTOS, L.F.; FERNANDES, I.A.O.; LATRILHA, F.O. Resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* isolados de origem humana e não humana, no estado de São Paulo, no período de 1996-2003. **Anais do V Encontro do Instituto Adolfo Lutz** - Encontro Nacional dos LACENS; outubro de 2003, São Paulo, Brasil. São Paulo: IAL, 2003, p.26.

FERNANDEZ, J.; FICA, A.; EBENSPERGER, G.; CALFULLAN, H.; PRAT, S.; FERNANDEZ, A.; ALEXANDRE, M.; HEITMANN, I. Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gelelectrophoresis and bacteriophage typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n.4, p.1617–1622, 2003.

FISHER, I.S. Dramatic shift in the epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types in western Europe, 1998–2003—results from the Enter-net International *Salmonella* database. **Eurosurveillance**, v. 9, n.11, p. 43–45, 2004.

FLUIT AC, SCHMITZ FJ. Class I integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. **Eur Journal Clinical Microbiological Infectious Diseases**; v. 18, p. 761-770, 1999.

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

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artimed, 2002.

FRANCO, B.D.G.M. Foodborne diseases in Southern South America. In: MILLIOTS, M.D.; BIER, J.W. **International handbook of foodborne pathogens**. Marcell Decker: 2003, p. 733-743.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996.

FUNDAÇÃO ESTADUAL DE PESQUISA E PRODUÇÃO EM SAÚDE. Instituto de Pesquisa Brasileira/Laboratório Central do Rio Grande do Sul. Relatório de Investigações de surtos de Salmonelose de 1984 a 1999. **FEPPS/IPB/LACEN**, Porto Alegre.

FUZHARA, T. O.; FERNANDES, S. A.; FRANCO, B. D. G. M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 1749-1753, 2000.

GALAN, J.E.; CURTISS, R. Expression of *Salmonella* Typhimurium genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling. **Infection and Immunity**, v. 58, p.1879–1885, 1990.

GALANIS, E.; WONG, D.M.A.; LO, F.O.; PATRICK, M.E.; BINSZTEIN, N.; CIESLIK, A.; CHALERMCHAIKIT, T.; AIDARA-KANE, A.; ELLIS, A.; ANGULO, F.J.; WEGENER, H.C. Web-based surveillance and global *Salmonella* distribution, 2000 to 2002, **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 381- 388, 2006.

GARAIZAR, J.; LÓPEZ-MOLINA, N.; LACONCHA, I.; BAGGESEN, D.L.; REMENTERIA, A.; VIVANCO, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I. Suitability of PCR fingerprinting, Infrequent-Restriction-Site PCR, and Pulsed Field Gel Electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in Library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.12, p. 5273-5281, 2000.

GATTO, A.J., PETERS, T.M., GREEN, J., FISHER, I.S., GILL, O.N., O'BRIEN, S.J., MAGUIRE, C., BERGHOLD, C., LEDERER, I., GERNER-SMIDT, P., TORPDAHL, M., SIITONEN, A., LUKINMAA, S., TSCHAPE, H., PRAGER, R., LUZZI, I., DIONISI, A.M., VANDER ZWALUW, W.K., HECK, M., COIA, J., BROWN, D., USERA, M., ECHEITA, A., THRELFALL, E.J. Distribution of molecular subtypes within *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 4 and *S. Typhimurium* definitive phage type 104 in nine European countries, 2000–2004: results of an international multi-centre study. **Epidemiology and Infectious**, v. 134, n. 4, p.729–736, 2006.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks

occurred in the South of Brazil, 1999 to 2000. **Journal of Food Safety**, v. 1, p. 1-1, 2005.

GEIMBA, M. P.; TONDO, E. C.; OLIVEIRA, F. A.; CANAL, C. W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1229-1233, 2004.

GIAOURIS, D.; NYCHAS, E. The adherence of *Salmonella enteritidis* PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. **Food Microbiology**, n. 23, v. 8, p. 747-752, 2006.

GILLESPIE, I.A., OBRIEN, S.J., ADAK, G.K., WARD, L.R., SMITH, H.R. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992–2002: where are the risks? **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 795–801, 2005.

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

GONZALEZ HEVIA, M.A., MENDOZA, M.C. Polymorphism of rRNA genes and plasmid analysis in the typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from a Spanish health area. **New Microbiologica**, v.18, p. 377–384, 1995.

GORMAN, R.; ADLEY, C. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food and animal sources in the Republic of Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p. 2314–2316, 2004.

GUDMUNDSDOTTIR, S.; HARDARDOTTIR, H.; GUNNARSON, E. Subtyping of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium outbreak strains isolated from humans and animals in Iceland. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 23, p. 4833–4835, 2003.

GUERRA, B.; SCHRORS, P; MENDOZA, M.C Application of PFGE performed with *XbaI* to an epidemiological and phylogenetic study of *Salmonella* serotype Typhimurium. Relations between genetic types and phage types. **New Microbiologica**, v. 23, p. 11–20, 2000.

GURTNER, V.; STANISICH, V.A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacers region. **Microbiology**, v.142, p. 3-16, 1996.

GÜRTNER, V., MAYALL, B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** , v. 51, p. 3–16, 2001.

HAEGHEBAERT, S.; LE QUERREC, F.; BOUVET, P.; GALLAY, A.; ESPIÉ, E.; VAILLANT, V. Les toxiinfections alimentaires collectives en France en 2001. **Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire**, v. 50, p. 249–254, 2002.

HAIN, T., WARD-RAINEY, N., KROPPESTED, R.M., STACKEBRANDT, E., RAINEY, F.A. Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 202-206, 1997.

HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; HELENIUS, H.; SIITONEN, A. Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, p. 996– 1003, 2001.

HAKANEN, A.; SIITONEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P. Increasing fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serotypes in Finland during 1995–1997. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 145–148, 1999.

HALD, B.; SKOVGARD, H.; BANG, D.D.; PEDERSEN, K.; DYBOH, C.; JESPERSEN, J.B.; MADSEN, M. Flies and Campylobacter Infections of Broiler flocks. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 1491-1492, 2004.

HANSON ND, MOLAND ES, HOSSAIN A, NEVILLE SA, GOSBELL IB, THOMSON KS. Unusual *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 1011 – 1014, 2002.

HEDGES, S.B.; PARKER, P.H.; SIBLEY, C.G.; KUMAR, S. Continental breakup and ordinal diversification of birds and mammals. **Nature**, v. 381, p. 226-229, 1996.

HEINITZ, M.L.; RUBLE, R.D.; WAGNER, D.E.; TATINI, S.R. Incidence of *Salmonella* in fish and seafood. **Journal of Food Protection**, v.63, p. 579-592, 2000.

HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity island 2. **Molecular Microbiology**, v. 36, p.1015-1023, 2000.

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

HERNÁNDEZ, T.; RODRIGUEZ-ALAVAREZ, C.; ARÉVOLO, M.P.; TORRES, A.; SIERRA, A.; ARIAS, A. Antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from chickens in Spain. **Journal of Chemotherapy**, v.14, p. 346-350, 2002.

HOOD, S. K.; ZOTTOLA, E. A. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. **International Journal of Food Microbiology**, USA, v. 37, n. 2/3, p. 145-153, 1997.

HOHMANN, E.L. Nontyphoidal salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 263-269, 2001.

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

HUMPHREY, T. J.; SLATER, E.; CALPINE, K. M.; ROWBURY, R. J.; GILBERT, R. J. *Salmonella enteritidis* Phage Type 4 isolates more tolerant of heat, acid, or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 3161-3164, 1995.

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**, v. 26, p. 2465-2466, 1988.

HURLEY, B.P.; McCORMICK, B.A. Translating tissue culture results into animal models: the case of *Salmonella typhimurium*. **Trends in Microbiology**, v.11, p.562-569, 2003.

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

INGRAHAM, J. 1987. Effect of temperature, pH, water activity, and pressure on growth, In F. C. Neidhardt, J. L. Ingraham, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, and H. E. Umbarger (ed.), **Escherichia coli and Salmonella typhimurium: cellular and molecular biology**, vol. 2. . Washington, D.C: American Society for Microbiology ,1987, p. 1543-1554.

ISENBARGUER, D.W.; HOGE, C.W.; SRIJAN, A.; PITARANGSI, C.; VITHAYASAI, N.; BODHIDATTA, L.; HICKEY, K. W.; CAM, P.D. Comparative antibiotic resistance of diarrheal pathogens from Vietnam and Thailand, 1996-1999. **Emerging Infectious Disease**, v.8; p. 175-180, 2002.

IZUMIYA, H.; NOJIRI, N.; HASHIWATA,Y.; TAMURA, K.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 12, 2003.

JACOBSEN, C.S.; HOLBEN, W.E. Quantification of mRNA in *Salmonella* spp. seeded soil and chicken manure using magnetic capture hybridization RT-PCR. **Journal of Microbiology Methods**, v. 69, p. 315–321, 2007.

JAY, J. **Microbiologia de Alimentos**. 6 Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

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**, v. 62, p. 2741-2746, 1996.

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**, v. 59, p. 945-952, 1993.

JIMÉNEZ, M.M.S.; CASTRO, N.M.C. Mecanismos de interacción de *Salmonella* con la mucosa intestinal. **Infection**, v.7, p.22-29, 2003.

JOHNSON, J.R.; CLABOTS, C.; AZAR, M. Molecular analysis of hospital cafeteria-associated salmonellosis outbreak using modified repetitive element PCR fingerprinting. **Journal of Microbiology**, v. 39, p. 3452–3460. 2001.

JORDAN, K. N.; OXFORD, L.; CONOR, P. O. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3048-3055, 1999.

JOSEPH, B.; OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, Indrani; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surface and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, V.64, p. 367-372, 2001.

KALENDER, H.; SEN, S.; HASMAN, H.; HENDRIKSEN, R.S.; AAESTRUP, F.M. Antimicrobial susceptibilities, phage types, and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from chickens and chicken meat in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, p.265-271, 2009.

KANELLOS, T. S.; BURRIEL A. R. The in vitro bactericidal effects of the food decontaminants lactic acid and trisodium phosphatate. **Food Microbiology**, v. 22, p. 591-594, 2005.

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**, v.27, p. 119-125, 1996.

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

KIESSLING, C.R.; CUTTING, J. H.; LOFTIS, M.; KIESSLING, W. M.; DATTA, A. R.; SOFOS, J. N. .Antimicrobial resistance of food-related *Salmonella* isolates, 1999-2000. **Journal of Food Protection**, 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 of Clinical Microbiology**, v. 31, p. 1108- 1110, 1993.

KONEMAN, E. K.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, W. C. **Diagnostic Microbiology**. 5 Ed. New York: Lippincott, 1997.

KOSTMAN, J.R.; EDLIND, T. D.; LIPUMA, J. J.; STULL, T. L. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal Clinical Microbiology**, v.30, p.2084-2087, 1992.

KUHN, H. Epidemiology of salmonellosis in Germany. **Biotest Bulletin**, v.5, p.157-170, 1995.

KUMAO, T.; BA-THEIN, W.; HAYASHI, H. Molecular subtyping methods for detection of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2057-2061, 2002.

KRISTIANSEN, M.A.M.; SANDVANG, D.; RASMUSSEN, T.B. In vivo development of quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4462– 4464, 2003.

LACONHA I.; BAGGESEN, D. L.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage type 1, 4, 6 and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 155-165, 2000.

LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I.; GARAIZAR, J. 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**, v. 40, p. 27–34, 1998.

LAGATOLLA, C.; DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAVENIA, A.; DI MICHELE, M.; TOMMASINI, T.; MONTI- BRAGADIN, C. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2440-2443, 1996.

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**, v. 47, p. 427–434, 1998.

LANDERAS, E.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; ALZUGARAY, R.; MENDOZA, M.C. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella* Enteritidis by ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p.2294–2296, 1996.

LEE, R. Pulsed-field gel electrophoresis of genomic digests demonstrates linkages among food, food handlers, and patrons in a food-borne *Salmonella javiana* outbreak in Massachusetts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 284-285, 1998.

LEE, L. A.; PUHR, N. D.; MALONEY, E. K.; BEAN, N. H.; TAUXE, R. V. Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in United States, 1989–1990. **Journal of Infectious Diseases**, v.170, p. 128–134, 1994.

LEE, A.L.; THREATT, V.L.; PUHR, N.D.; LEVINE, P.; FERRIS, K.; TAUXE, R.V. Antimicrobial resistant *Salmonella* spp isolated from healthy broiler chickens after

slaughter. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 202, p. 752-755, 1993.

LEHNER, A.F.; HARVEY, S.; HILL, C.W. Mapping and spacer identification of rRNA operons of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v.160, p. 682-686, 1984.

LEITNER K. Observaciones de aperture. In: **Foro Mundial FAO/OMS de Autoridades de Regulación Sobre la Inocuidad de los Alimentos**, 2. 2004, Bangkok. **Anais...**Bangkok: FAO/OMS, 2004. p. 64-66.

LEYER, G. J.; JOHNSON, E. A. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**, v, 58, p. 2075-2080, 1992.

LIEBANA, E.; CLOUTING, C.; GARCIA-MIGURA, L.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; LINDSAY, E.; THRELFALL, E.J.; DAVIES, R.H. Multiple genetic typing of *Salmonella* Enteritidis phage-types 4, 6, 7, 8 and 13a isolates from animals and humans in the UK. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 189–195, 2004.

LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; CLOUTING, C.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; BRESLIN, M.; DAVIES, R. H. Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 1024, 2003.

LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; GUARD-PETTER, J.; MCDOWELL, S.W.; RANKIN, S.; OPITZ, H.M.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; DAVIES, R.H. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage-types 4,6–8, 13a, 29 and 34: a comparative analysis of genomic fingerprints from geographically distant isolates. **Journal of Clinical Microbiology**; v.92, p. 196–209, 2002

LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; BRESLIN, M.F.; DAVIES, R.H.; WOODWARD, M.J. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p.154–161, 2001.

LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; BRESLIN, M. F.; DAVIES, R. H.; WOODWARD, M.J. Diversity of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 154-161, 2001.

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

LIN, A.W., USERA, A.M., BARRET, T.J., GOLDSBY, R.A. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 870-876, 1996.

LINDSTEDT, B.A.; HEIR, E.; VARDUND, T.; KAPPERUD, G. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica*

subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.1623-1627, 2000.

LING, M.L.; WANG, G.C.Y. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates in Singapore. **The Journal of Infection**, v. 43, p.169-72, 2001.

LING, J.M., KOO, I. C., KAM, K. M., CHENG, A. F. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 1693-1699, 1998.

LIU, S.L.; SCHRYRERS, A.B.; SANDERSON, K.E.; JOHNSTON, R.N. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. **Journal of Bacteriology**, v.181, p. 6747-55, 1999.

LIU, S.L.; HESSEL, A.; SANDERSON, K.E. The *XbaI*–*BlnI*–*CeuI* genomic cleavage map of *Salmonella typhimurium* LT2 determined by double digestion, end labelling and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 4104–4120, 1993.

LOPALCO, P. L.; GERMINARIO, C.; DI MARTINO, V.; FRISOLI, L.; PAGANO, A.; QUARTO, M.; BARBUTI, S. Epidemiologic study and cost analysis of an *Salmonella* Enteritidis epidemic. **Annali di igiene : medicina preventiva e di comunità**, v.12, p. 279-285, 2000.

LÓPEZ-MOLINA, N.; LACONCHA, I.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I.; GARAIZAR, J. Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types by PCR fingerprinting. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p. 877-882, 1998.

LUKINMAA, S.; SCHILDT, R.; RINTTILA, T.; SIITONEN, A. *Salmonella* Enteritidis phage types 1 and 4: pheno- and genotypic epidemiology of recent outbreaks in Finland. **Journal of Clinical Microbiology**, v..37, n.7, p. 2176–2182, 1999.

LUZ, S.P.; RODRIGUEZ-VALERA, F.; LAN, R.; REEVES, P. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. **Journal of Bacteriology**, v.180, p.2144-2151, 1998.

LYNCH, M.; PAINTER, J.; WOODRUFF, R.; BRADEN, C. Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 1998—2002. **MMWR Surveillance Summaries**, v.10, p. 1-34, 2006.

LYTIKAINEN, O.; KOORT, J.; WARD, L.; SCHILDT, R.; RUTU, P.; JAPISSON, E.; TIMONEN, M.; SIITONEN, A. Molecular epidemiology of an outbreak caused by *Salmonella enterica* serovar Newport in Finland and the United Kingdom. **Epidemiology and Infection**, v. 124, p. 185– 192, 2000.

MACHADO, T. L. 2007. **Avaliação da aderência de três sorotipos de**

***Salmonella* ao aço inoxidável e ao polietileno e da capacidade de desinfecção dessas superfícies.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Agronomia. RS: 2007.

MAGALHÃES, V.D.; PEREIRA, C.R.; SILVA, C.V. ; KAWAGOE, J. Y. ; CARDOSO, M. F.; ANDREAZZI, D.; LIVIANU, J. ; WEI, S. B. ; KNOBEL, E.; COSCINA, A. L. Third generation cephalosporins selecting a particular strain of multiresistant *Staphylococcus aureus*. In: 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, Miami Beach, Florida; 195L: 375, 1997.

MAISNIER-PATIN, S.; BERG, O. G.; LILJAS, L.; ANDERSSON, D. J. Compensatory adaptation to the deleterious effect of antibiotic resistance in *Salmonella typhimurium*. **Molecular Microbiology**, v. 46, p. 355– 366, 2002.

MALHEIROS, P. S.; BRANDELLI, A. ; NOREÑA, C.P.Z. ; TONDO, E. C. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. **Journal of Food Safety**, v. 29, p. 302-317, 2009.

MALHEIROS, P. S.; PAULA, C. M. D. DE ; TONDO, E. C. Avaliação da cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com outros sorotipos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 751-755, 2007.

MALORNY, B.; BUNGE, C.; HELMUTH, R. A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. **Journal of Microbiology Methods**, v.70, p. 245–251, 2007.

MALORNY, B., HOORFAR, J., BUNGE, G., HELMUTH, R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p.290–296, 2003.

MANIE, T.; KHAN, S.; BROZEL, V.S.; VEITH, W.J.; GOUWS, P.A. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in Soth Africa. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p.253-258, 1998.

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**, v. 64, p. 237-245, 2001.

MASLOW, J.N.; SLUTSKY, A.M.; ARBEIT, R.D. Application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: Pressing, D.H., Smith, T.K, White, T.J. (Eds.), **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. 1993. American Society for Microbiology, Washington, D.C., p. 563–572, 1993.

MATUSHEK, M. G. et al. Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel eletroforesis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2598-2600, 1996.

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C. et al. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.5, n.5, p. 607-612, 1999.

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

MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M.; SCHWARZ, S. Molecular analysis of *Salmonella enterica subsp. enterica* serovar Agona isolated from slaughter pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 112, p. 43-52, 2006.

MILLEMANN, Y.; GAUBERT, S.; REMY, D.; COLMIN, C. Evaluation of IS200-PCR and comparasion with other molecular markers to trace *Salmonella enterica* subsp. enterica serotype Typhimurium bovine isolates from farm to meat. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 2204-2209, 2000.

MILLEMANN, Y.; LESAGE-DESCAUSES, M.C.; LAFONT, J.P.; CHASLUS-DANCLA, E. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 14, p. 129-134. 1996.

MILLEMANN, Y., LESAGE-DESCAUSES, M.C., LANFONT, J.P., CHASLUS-DANCLA, E. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 173-179, 1995.

MILLS, D.M.; BAJAJ, V.; LEE, C.A. A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella* Typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. **Molecular Microbiology**, v. 15, p.749–759, 1995.

MIRAGAIA, M.; COUTO, I.; PERRERIA, S.F.; KRISTINSSON, K.G.; WESTH, H.; JARLOV, J.O.; CARRIÇO, J.; ALMEIDA, J.; SANTOS-SANCHES, I.; DE LENCASTRE, H. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence geographic dissemination. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 430-438, 2002.

MOLBAK, K.; GERNER-SMIDT, P.; WEGENER, H.C. Increasing quinolone resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.514-515, 2002.

MURAKAMI, K., HORIKAWA, K., OTSUKI, K. Epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis from human outbreaks by pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 61, p. 439– 442, 1999.

MURASE, T.; OKITSU, T.; SUZUKI, R.; MOROZUMI, H.; MATSUSHIMA, A.; NAKAMURA, A.; YAMAI, S. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as an

epidemiologic tool for *Salmonella* infections. **Microbiology and Immunology**, v. 39, p. 673–676, 1995.

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

MÜRMANN, L.; DOS SANTOS, M.C.; CARDOSO, M. Prevalence, genetic characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from fresh pork sausages in Porto Alegre, Brazil. **Food Control**, v. 20, p. 191–195, 2009.

NADVORNY, Y. A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no RS em 2000. **Acta Scientiae Veterinae**, v. 32, n.1, p. 47–51, 2004.

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

NAIR, S.; SCHREIBER, E.; THONG, K.L.; PANG, T.; ALTWEGG, M. Genotypic characterization of *Salmonella typhi* by amplified fragment length polymorphism fingerprinting provides increased discrimination as compared to pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. **Journal of Microbiology Methods**, v. 41, p. 35–43, 2000.

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

NAYAK, R.; STEWART, T.; WANG, R.F.; LIN, J.; CERNIGLIA, C.E.; KENNEY, P.B. Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic –resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, p. 51–62, 2004.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (2000) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard M2-A7. NCCLS.

NORMARK, B.H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**, v.252, p. 91–106, 2002.

NORRUNG, B.; BUNCIC, S. Microbial safety of meat in the European Union, **Meat Science**, v. 78, p. 14–24, 2008.

NOVINSKAK, A.; SURETTE, C.; FILION, M. Quantification of *Salmonella* spp. in composted biosolids using a TaqMan qPCR assay. **Journal of Microbiological Methods**, v. 70, p. 119–126, 2007.

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

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: A Model for Bacterial Pathogenesis. **Annual Reviews of Medicine**, v. 52, p. 259-74, 2001.

OLIVEIRA, F. A.; GEIMBA, M.P.; PASQUALOTTO, A.P.; BRANDELLI, A.; PASQUALI, G.; SILVA, W.P.; TONDO, E.C. Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**, v.20, p.606-610, 2009.

OLIVEIRA, F. A.; FRAZZON, A.P.G.; BRANDELLI, A.; TONDO, E.C. Use of PCR-Ribotyping, RAPD, and Antimicrobial Resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v.1, p.170-176, 2007.

OLIVEIRA, F.A.; BRANDELLI, A.; TONDO, E.C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil, **The New Microbiologica**, n. 29, p. 49-54, 2006.

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**, v.97, p.297–305, 2005.

OLSEN, J.E.; SKOV, M.N.; THRELFALL, E.J.; BROWN, D.J. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. **Journal of Medical Microbiology**, v.40, p.15–22, 1994.

OLSEN, J. E.; BROWN, D.J.; SKOV, M.N.; CHRISTENSEN, J.P. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock. **The Veterinary Quarterly**, v. 15, p. 125-135, 1993.

PADUNGTOOD, P.; KANEENE, J.B. *Salmonella* in food animals and humans in northern Thailand. **International Journal of Food Microbiology**, v.108, p. 346–354, 2006.

PANG, J.C.; CHIU, T.H.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; GUERRA, B.; TSEN, H.Y. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 305–312, 2007.

PANG, J.C., CHIU, T.H., CHIOU, C.S., SCHROETER, A., TSEN, H.Y. Pulsed field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p.1472–1483, 2005.

PARRY, C.M. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.16, p..467- 472, 2003.

PATEL, J.C.; ROSSANESE, O.W.; GALÁN, J.E. The functional interface between *Salmonella* and its host cell: opportunities for therapeutic intervention. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.26, p.564–570, 2005.

PERALES, I.; AUDICANA, A. The role of hen´s eggs in outbreaks of salmonellosis in north Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 178-180, 1989.

PERESI, J. T. M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública.**, v. 32, n. 5, p..477-483, 1998.

PEREZ, K. J. Avaliação da capacidade de invasão intestinal de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares ocorridos no Rio Grande do Sul. 2008. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, .*Orientador*: Eduardo Cesar Tondo.

PHAN-THANH, L.; MAHOUI, F.; ALIGE, S. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 55, p.121 -126, 2000.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, DE GROOT, T. B.; FRIIS, C.; JONES, R.; NIGHTINGALE, C.; PRESTON, R.; WADDELL, J. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 53, p. 28–52, 2004.

PHILIPS, C.A.; GEORGE, J. T. Guess what's lurking in the lunch? **Biologist**, v. 41, p. 76-80, 1994.

PIDDOCK, L.J.V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from human and food animals. **FEMS Microbiology Reviews**, v.26, p.3-16, 2002.

PIDDOCK, L.J.V.; GRIGGS, D.J.; HALL, M.C.; JIN, Y.F. Ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Salmonella typhimurium* obtained from two patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 37, p. 662–666, 1993.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2001 (n°.45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v.154, n3, p.173-174, 2003.

POWELL, N.G., THRELFALL, E.J., CHART, H., ROWE, B. Subdivision of *Salmonella* Enteritidis PT4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. **FEMS Microbiology Letters**, v. 119, p. 193–198, 1994.

PRIETO, R. G.; ALEJANDRE, C. G.; MECA, A. A.; BARRERA, V. H.; DE MIGUEL, A. G. Epidemiology of hospital-treated *Salmonella* infection; Data from a national cohort over a ten-year period. **Journal of Infection**, v. 58, p.175-181, 2009.

PUNIA, P.; HAMPTON, M.D.; RIDLEY, A.M.; WARD, L.R.; ROWE, B.; THRELFALL, E.J. Pulsed-field electrophoretic fingerprinting of *Salmonella* indiana and its epidemiologic applicability. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 103–107, 1998.

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

RAJASHEKARA, G.; HAVERLY, E.; HALVORSON, D.A.; FERRIS, K.E.; LAUER, D.C.; NAGARAJA, K.V. Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in poultry. **Journal of Food Protection**, v.63 n.2, p.155-161, 2000.

RANKIN SC, ACETO H, CASSIDY J, HOLT J, YOUNG S, LOVE B, TEWARI D, MUNRO DS, BENSON CE. Molecular characterization of cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport isolates from animals in Pennsylvania. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 4679-4684, 2002.

REFSUM, T.; HEIR, E.; KAPPERUD, G.; VARDUND, T.; HOLSTA, G. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar thyphimurium isolates determined by pulsed field gel electrophoresis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic animals, and the environment in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5600-5606, 2002.

RELATÓRIOS ANUAIS de ETA. Secretaria Estadual de Saúde e do Meio Ambiente. Divisão de Vigilância Sanitária: 1987-1998. Porto Alegre, (2000). Não paginado.

RHEN, M.; DORMAN, C.J. Hierarchical gene regulations adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. **International Journal of Medical Microbiology**, v.294, p.487–502, 2005.

RIDLEY, A. M.; THREFALL, E. J.; ROWE, B. Genotypic characterization of *Salmonella* enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2314-2321, 1998.

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**, v.105, p. 21–7,1990.

RUPALI, P.; ABRAHAM, O.C.; JESUDASON, M.V.; JOHN, T.J.; ZACHARIAH, A.; SIVARAM, S.; MATHAI, D. Treatment failure in typhoid fever with ciprofloxacin susceptible *Salmonella enterica* serotype Typhi. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 49, p.1– 3, 2004.

RYCHLIK, I.; BARROW, P.A. *Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 1021–1040, 2005.

SAEED, A.M.; WALK, S.T.; ARSHAD, M.;WHITTAM, T.S. Clonal structure and variation in virulence of *Salmonella* Enteritidis isolated from mice, chickens, and humans. **Journal of AOAC International**, v.89, p.504–11, 2006.

SALAMON, H.; BEHR, M.A.; RHEE, J.T.; SMALL, P.M. Genetic distances for the study of infectious disease epidemiology. **American Journal of Epidemiology**, v. 151, p. 324–334, 2000.

SANTOS, L.R.; DICKEL, E.L.; RODRIGUES, L.B.; NASCIMENTO, V.P.; RIBEIRO, A.R. identificação de *Salmonella* Enteritidis fagotipo 6^a em amostras de alimentos, humanos e materiais de origem avícola. **Higiene Alimentar**, v. 18, p. 64-67, 2004.

SANTOS, L. R.; DICKEL, E.L.; RODRIGUES, L. B.; NASCIMENTO, V.P.; RIBEIRO, A.R. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridas entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Higiene Alimentar**, v. 16, p. 93-99, 2002.

SANTOS, D. M. S.; JUNIOR, A. B.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; AMARAL, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 20: 39-42, 2000.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 14-56, 2004.

SCHWARZ, S.; LIEBISCH, B. Pulsed-field gel electrophoretic identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium live vaccine strain Zoosaloral H. **Letters in Applied Microbiology**, v.19, p.469–472, 1994.

SCUDERI G.; FANTASIA, M.; FILETICI, E.; ANASTASIO, M.P. Foodborne outbreak caused by *Salmonella* in Italy, 1991-4. **Epidemiology and Infection**, v. 116, p. 257-265, 1996.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. (SVS) Boletim Eletrônico Epidemiológico. Ano 5, número 06, 28/12/2005 **VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS NO BRASIL, 1999 – 2004**. ANO 5 – Nº 06 - 28/12/2005. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/busca/buscar.cfm>> Acesso em: 16/11/2006.

SENO, M.; SAKAKI, M.; OGAWA, H. Genotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolates from sporadic patients in limited area during one year. **Journal of Infection**, v. 49, p. 291–296, 2004.

SEYFARTH, A.M.; WEGENER, H.C.; FRIMODT-MOLER N. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium from humans and production animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, p. 67–75, 1997.

SHAH, S. A; ROMICK, T. L. Subspecies differentiation of *Salmonella* by PCR-RFLP of the ribosomal operon using universal primers. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p. 54-57, 1997.

SHARMA, R.; SHARMA, C.L.; KAPOOR, B. Antibacterial resistance: current problems and possible solutions. **Indian Journal of Medical Sciences**, v. 59, n. 3, p.120-129, 2005.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* sp. And *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 439-447. 2000.

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

SILVEIRA, J. B. Salmoneloses ocorridas no Rio Grande do Sul no período de 2000 a 2001. Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS, para obtenção do título de Especialista em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, 2005.

SILVEIRA, J.B.; TONDO, E.C. Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM *SALMONELLA* AND SALMONELOSIS, 2006, Saint-Malo, France. **Epidemiology and Public Health**. Saint Malo, France: Pierre Colin e Geneviève Clément, 2006. Sessão 5, p. 521-522.

SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R., 1973. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco.

SOFOS, J. N. Challenges to meat safety in the 21st century. **Meat Science**, v. 78, p. 3-13, 2008.

SOLANO, C.; GARCÍA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J.M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analyses of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 793- 808, 2002.

SOTO, S.M.; GUERRA, B. ;DEL CERRO, A.; GONZÁLEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Outbreaks and sporadic cases of *Salmonella* serovar Panama studied by DNA fingerprinting and antimicrobial resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 45–53, 2001.

SPRINGER, S.;LINDNER, T.; STEINBACH, G.; SELBITZ, H.J. Investigation of the efficacy of a genetically-stable live *Salmonella typhimurium* vaccine for use in swine. **Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.**, v.114, p. 342–345, 2001.

STANLEY, J.; BURNENS, A.P.; THRELFALL, E.J.; CHOWDRY, N.; GOLDSWORTHY, M. Genetic relationships among strains of *Salmonella enteritidis* in a national epidemic in Switzerland. **Epidemiology and Infection**, v.108, p.213-220, 1992.

STEVENS, A.; KEROUANTON, A.; MARAULT, A.; MILLEMANN, Y.; BRISABOIS, A.; CAVIN, J.F.; DUFOUR, B. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* from beef sampled in the slaughterhouse and retailers in Dakar (Senegal) using pulsed-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility testing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 123, p.191-197, 2008.

STREIT, J. M.; JONES, R.N.; TOLEMAN, M.A.; STRATCHOUNSKI, L.S.; FRITSCH, T.R. Prevalence and antimicrobial susceptibility patterns among gastroenteritis-causing pathogens recovered in Europe an Latin America and *Salmonella* isolates recovered from bloodstream infections in North America and Latin America: reort from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2003). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 367-375, 2006.

STRUELENS, M.J.; DE GHEIDRE, Y.; DEPLANO, A. Comparative and library epidemiological typing systems: outbreak investigations versus surveillance systems. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.19, p. 565–569, 1998.

SZYCH, J.; CIESLIK, A.; PACIOREK, J.; KALUZEWSKI, S. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica subsp.enterica* strains isolated in Poland from 1998 to 1999. **International Journal Antimicrobial Agents**, v. 18, p. 37-42, 2001.

SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T. J.;HUNTER, S. B.; TAUXE, R.V. CDC PulseNet Task Force. PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. **Emerging Infectious Diseases** , v. 7, n. 3, p. 382-389, 2001.

TASSIOS, P.T.; MARKOGIANNAKIS, A.; VATOPOULOS, A. C.; KATSANIKOU, E.; VELONAKIS, E. N.; KOUREA-KREMASTINO, J.; LEGAKIS, N. J. Molecular

epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* during a 7-years period in Greece. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 1316-1321, 1997.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C.; PERESI, J. T.; FUZIHARA, T. O.; YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, p.1041-1044, 2002.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.38,n.5, p.315-322,1996.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.

TESSI, M.A.; SALSÌ, M.; CAFFER, M.; MOGUILEVSKI, M.A. Drug resistance of Enterobacteriaceae isolated from chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 1001-1005, 1997.

THONG, K.L.; PASSEY, M.; CLEGG, A.; COMBS, B.G.; YASSIN, R.M.; PANG, T. Molecular analysis of isolates of *Salmonella typhi* obtained from patients with fatal and nonfatal typhoid fever. **Journal of Clinical Microbiology**, v 34, n. 4, p.1029–1033, 1996.

THONG, K. L.; NGEOW, Y. F.; ALTWEGG, M.; NAVARATNAM, P.; PANK, T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* pulsed field gel electrophoresis and ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1070–1074, 1995.

THRELFALL, E.J.; DAY, M.; PINNA, E.; CHARLETT, A.; GOODYEAR, K.L. Assessment of factors contributing to changes in the incidence of antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica* serotypes Enteritidis and Typhimurium from humans in England and Wales in 2000, 2002 and 2004. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 28, p. 389–395, 2006.

THRELFALL, E.J.; POWELL, N.G.; ROWE, B. Differentiation of *salmonellas* by molecular methods. **PHLS Microbiol.Dig.**, v. 11, 199-202, 1994.

THRELFALL, E.J.; TEALE, C.J.; DAVIES, R.H.; WARD, L.R.; SKINNER, J.A.; GRAHAM, A.; CASSAR, C.; SPEED, K. A comparison of antimicrobial susceptibilities in non-typhoidal *Salmonella* from humans and food animals in England and Wales. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, p. 183–189, 2003.

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.

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

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

TSEN, H.Y.; HU, H.H.; LIN, J.S.; HUNG, C.H.; WANG, T.K. Analysis of the *Salmonella typhimurium* isolates from food-poisoning cases by molecular subtyping methods. **Food Microbiology**, v. 17, p. 143-152, 2000.

TSEN, H.Y.; LIN, J.S.; HU, H.H.; LIU, P.R.; WANG, T.K. Use of pulsed field gel electrophoresis as an epidemiological tool for analysis of sporadic associated strains of *Salmonella* Typhi isolated in Taiwan. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 761-768, 1999.

UPHOLT, W.B. Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. **Nucleic Acids Research**, v. 4, p. 1257-1265, 1977.

USERA, M.A.; ALADUEÑA, A.; GONZÁLEZ, R.; de La FUENTE, M.; GARCÍA-PEÑA, J.; FRÍAS, N.; ECHEITA, M.A. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. From animals sources in Spain in 1996 and 2000. **Journal of Food Protection**, v.65, p.768-773, 2002.

VALDEZATE, S.; ARROYO, M.; GONZALEZ-SANZ, R.; RAMIRO, R.; HERRERA-LEON, S.; USERA, M.A.; DE LA FUENTE, M.; ECHEITA, A. Antimicrobial resistance and phage and molecular typing of *Salmonella* strains isolated from food for human consumption in Spain. **Journal of Food Protection**, v.70, n.12, p. 2741- 2748, 2007.

VAN BELKUM, A. DNA fingerprinting of medically important microorganisms by use of PCR. **Clinical Microbiology Reviews**; n. 7, v. 2, p. 174-184, 1994.

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

VASALLO, F.J.; MARTIN-RABADAN, P.; ALCALA, L.; GARCIA-LECHUZ, J.M.; RODRIGUEZ-CREIXEMS, M.; BOUZA, E. Failure of ciprofloxacin therapy for invasive nontyphoidal salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.26, p.535-536, 1998.

VAZ, C. S. L.; STRECK, A.F.; TRAMONTINA, T.; CARDOSO, M.R.I.; CANAL, C.W. Use of a modified AFLP protocol to discriminate *Salmonella enterica subsp.*

enterica serovar Enteritidis isolates. **Acta Scientiae Veterinariae (Online)**, v. 35, p. 41-48, 2007.

VELGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, v. 36, p.267-288, 2005.

VIEIRA-PINTO, M.; TENREIRO, R.; MARTINS, C. Unveiling contamination sources and dissemination routes of *Salmonella* sp. in pigs at a Portuguese slaughterhouse through macrorestriction profiling by pulsed-field electrophoresis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 77–84, 2006.

XIA, O.; ZHAO, S.; SMITH, A.; MCEVOY, J.; MENG, J.; BHAGWAT, A.A. Characterization of *Salmonella* isolates from retail foods based on serotyping, pulse field gel electrophoresis, antibiotic resistance and other phenotypic properties. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 93–98, 2009.

YAN, J.J.; KO, W.C.; CHIU, C.H.; TSAI, S.H.; WU, H.M.; WU, J.J. Emergence of ceftriaxone-resistant *Salmonella* isolates and rapid spread of plasmid-encoded CMY-2-like cephalosprinase, Taiwan. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, p. 323–328, 2003.

YANG, S.J.; PARK, K. Y.; KIM, S. H.; NO, K. M.; BESSER, T. E.; YOO, H. S.; KIM, S. H.; LEE, B. K.; PARK, Y. H. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**, v.86, p. 295-301, 2002.

WALLACE, D.J.; VAN GILDER, T.; SHALLOW, S.; FIORENTINO, T. ; SEGLER, S.D.; SMITH, K.E.; SHIFERAW, B.; ETZEL, R.; GARTHRIGHT, W. E.; ANGULO, F. J. Incidence of foodborne illnesses reported by the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet)-1997. FoodNet Working Group, **Journal of Food Protection**, v. 63, p. 807–809, 2000.

WEIDE-BOTJES, M. KOBE, B.; LANGE, C, SCHWARZ, S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Hadar: evaluation and application of different typing methods. **Veterinary Microbiology**, v. 61, p. 215-227, 1998.

WEIGEL, R. M.; QIAO, B.; TEFEREDEGNE, B.; SUH, D.K.; BARBER, D.A.; ISAACSON, R.E.; WHITE, B.A. Comparison of pulsed field gel electrophoresis and repetitive sequence polymerase chain reaction as genotyping methods for detection of genetic diversity and inferring transmission of *Salmonella*. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 205–217, 2004.

WILDE, S.; JORGENSEN, F.; CAMPBELL, A.; ROWBURY, R.; HUMPHREY, T. Growth of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 in media containing glucose results in enhanced RpoS-independent heat and acid tolerance but does not affect

the ability to survive air-drying on surfaces. **Food Microbiology**, v.17, p.679-686, 2000.

WHEELER, J.G.; SETHI, D.; COWDEN, J.M.; WALL, P.G.; RODRIGUES, L.C.; TOMPKINS, D.S.; HUDSON, M.J., RODERICK, P.J. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. **The Infectious Intestinal Disease Study Executive**, v. 318, p. 1046-1050, 1999.

WHITTAM, T.S.; BERGHOLZ, T.M. Molecular subtyping, source tracking and food safety. In: J.W.S. Domingo and M.J. Sadowsky, Editors, **Microbial Source Tracking**, ASM Press, Washington, D. C. ,2007, p. 93–136.

WINFIELD, M. D., GROISMAN, E. A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 3687-3694, 2003.

WIT, M.A.S.; KORTBEEK, L.M.; KOOPMANS, M.P.G.; DE JAGER, C.J.; WANNET, W.J.B.; BARTELD, A.I.M.; VAN DUYNHOVEN Y.T.H.P. Comparison of gastroenteritis in a general practice-based study and a community-based study. **Epidemiology and Infection**, v. 127, n. 3, p.389-397, 2001.

WOO, Y.; LEE, S. Genetic diversity of multi-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from animals and humans, **Journal of Microbiology**, v. 44, p. 106–112, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Joint FAO/OIE/WHO** expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: scientific assessment. Geneva, Switzerland: **WHO**; 2004.

ZHAO S, QAIYUMI S, FRIEDMAN S, et al. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Newport isolated from humans and food animals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5366–5371, 2003.

ZHANG, S.; KINGSLEY, R. A.; SANTOS, R. L.; POLYMENIS, A. H.; RAFFATELLU, M.; FIGUEIREDO, J.; NUNES, J.; TSOLIS, R. M.; ADAMS, G. L.; BAÜMLER, A. J. Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 1–12, 2003.

ZHENG, J.; KEYS, C.E.; ZHAO, S.; MENG, J.; BROWN, E.W. Enhanced subtyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1932-1935, 2007.