



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUCIANA BILL MIKITO KOTTWITZ

***Salmonella* spp.:** avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de isolados epidêmicos e de origem avícola.

LUCIANA BILL MIKITO KOTTWITZ

***Salmonella* spp.:** avaliação epidemiológica de surtos
notificados no Paraná e caracterização de isolados epidêmicos
e de origem avícola.

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira

Londrina
2009

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

K87s Kottwitz, Luciana Bill Mikito.

Salmonella spp. : avaliação epidemiológica de surtos notificados no
Paraná e caracterização de isolados epidêmicos e de origem avícola /
Luciana Bill Mikito Kottwitz. – Londrina, 2009.
128 f. : il.

Orientador: Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira.

Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade
Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-
Graduação em Ciência de Alimentos, 2009.

Inclui bibliografia.

1. Salmonella enteritides – Teses. 2. Salmonelose – Teses. 3. Alimentos
– Microbiologia – Teses. 4. Ovos – Contaminação – Teses. I. Oliveira,
Tereza Cristina Rocha Moreira de. II. Universidade Estadual de Londrina.
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência
de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

LUCIANA BILL MIKITO KOTTWITZ

***Salmonella* spp.:** avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de isolados epidêmicos e de origem avícola.

Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Wanda S. M. Abrahão
LACEN – PR

Profa. Dra. Jane Martha G. Mikcha
UEM – Maringá – PR

Profa. Dra. Halha O. Saridakis
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra. Elisa Yoko Hirooka
UEL – Londrina – PR

Londrina, 05 de junho de 2009.

DEDICATÓRIA

Ao meu grande amor Volnei, pelo companheirismo, amor, incentivo, apoio nos momentos difíceis, paciência, dedicação e por não medir esforços para me fazer feliz.

Ao meu filho Bernardo, um pedaço de mim, que trouxe muito mais vida a minha vida e por ser muito além do que eu esperava, mesmo em meus melhores sonhos.

Aos meus pais, Paulo e Olga, pelo amor incondicional que sempre dedicaram a mim, por serem sempre um “porto seguro” apesar da distância física e pelo exemplo de caráter e humildade.

A minha irmã Patrícia e meu sobrinho Luiz Paulo, por tanta dedicação, torcida e amor em todos os momentos da minha vida.

AMO VOCÊS.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela proteção e saúde durante estes longos anos de estrada e por iluminar o meu caminho colocando ao meu lado pessoas especiais, que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente e me impulsionaram para que eu conseguisse chegar até aqui.

À Profa. Dra. Tereza Cristina R. M. de Oliveira pelo exemplo de uma orientação dedicada, pela paciência, pela compreensão em momentos especiais, pelos ensinamentos ao longo destes 8 anos de convivência e, acima de tudo por ser tão humana.

Ao Diretor do Laboratório Central do Estado (LACEN/PR), Marcelo Pilonetto, à Wanda S. M. Abrahão da Seção de Microbiologia de Alimentos do LACEN, à Sônia Farah da Seção de Bacteriologia do LACEN e ao Marcelo Trevisan do Setor de Vigilância Epidemiológica da Secretaria Estadual de Saúde do Paraná, pela disponibilização dos dados e das cepas de *Salmonella*, sem as quais este trabalho não seria possível.

Ao Dr. Alberto Back e sua esposa Alice por cederem as instalações do Centro de Diagnóstico Veterinário Brasil Sul Ltda – MERCOLAB de Cascavel/PR para realização de uma parte dos experimentos deste trabalho, pela cessão de cepas de origem avícola, pela orientação, amizade, confiança e incentivo.

À equipe do laboratório MERCOLAB que me auxiliou com muito carinho, disponibilidade e atenção, à Dra. Joice A. Leão pelas orientações e pela ajuda importantíssima na obtenção de uma parte das amostras analisadas neste trabalho.

À Profa. Dra. Libera Maria Dalla Costa, do Laboratório de Bacteriologia/ Biologia Molecular para Doenças Infecciosas, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, pela imensurável ajuda, pela confiança em auxiliar-me na parte experimental, cedendo o laboratório para as análises de PFGE sem medir esforços e com muita disponibilidade.

À Mara Scheffer, do Laboratório de Bacteriologia/ Biologia Molecular para Doenças Infecciosas, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR , pela preciosa ajuda na realização das análises de PFGE e na construção dos dendrogramas.

Às Dras. Eliane M. Falavina dos Reis e Dália dos Prazeres Rodrigues, do Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ – Rio de Janeiro/RJ), pela realização da confirmação sorológica e fagotipagem das cepas analisadas neste trabalho.

Às professoras Dras. Halha e Gislaine da Universidade Estadual de Londrina pelas importantes sugestões feitas no exame de qualificação.

Ao Prof. Rinaldo F. Gandra, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – *Campus Cascavel/PR*, pelo auxílio na interpretação de resultados PFGE.

À Sandra Rezende da Secretaria de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pela atenção e toda disponibilidade em auxiliar-me sempre.

À Profa. Marta T. Benassi do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pelo incentivo, amizade, atenção e carinho.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, pela competência na transmissão dos conhecimentos.

À Secretaria de Agricultura do Município de Cascavel/PR, na pessoa do colega Méd. Veterinário João Carlos Koehler, do Serviço de Inspeção Municipal – SIM/POA/SEAGRI/CVEL, pelo contato com os proprietários das granjas de ovos de postura, possibilitando a realização de parte dos experimentos desta tese nestas propriedades.

Aos pequenos produtores de ovos registrados junto ao SIM/POA/SEAGRI/CVEL, por cederem suas instalações e ovos para esta pesquisa.

Ao colega Méd. Veterinário Wilson Pabis por ceder parte das amostras analisadas neste trabalho.

Às bibliotecárias Olga e Bete, do setor de referências da biblioteca central da UEL que me auxiliaram muito na disponibilização de material bibliográfico necessário para esta tese.

Ao Colegiado de Farmácia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE – *Campus Cascavel/PR*, especialmente às Professoras Luciana Oliveira de Fariña e Daniela F. Miyata de Oliveira, por dispensarem minha participação em atividades do curso em ocasiões necessárias para a execução deste trabalho.

Às amigas de doutorado Rafaela e Marcí pelo auxílio na realização de testes de sensibilidade a antimicrobianos, pela disponibilidade, amizade e carinho.

Ao meu esposo Volnei, que além da dedicação, amor, incentivo, e apoio nos momentos difíceis, foi quem me impulsionou a iniciar este trabalho não deixando que eu desistisse em momento algum e que me apoiou financeiramente para a concretização deste sonho.

Ao meu pai, Paulo, por me ensinar os verdadeiros valores da vida: amor, trabalho e honestidade. À minha mãe, Olga, por me ensinar a ter fé, pelas orações nos momentos difíceis e pela irrestrita ajuda durante meu preparo para a qualificação e defesa. À minha irmã Patrícia pelo amor, torcida, dedicação e conforto nas horas difíceis. Ao meu sobrinho Luiz Paulo, por trazer tanta alegria em nossas vidas.

Ao meu sogro Anildo e minha sogra Lúcia por torcerem por mim, pela compreensão, por todo carinho, amor e atenção.

A minha prima-irmã Claudinha, por ser esta pessoa maravilhosa que é, pela torcida, carinho e por não medir esforços em auxiliar-me em todos os momentos da minha vida.

A minha amiga Marta, por acreditar muito em mim, pelo carinho em todas as horas, por todos os momentos em que esteve presente na minha vida, incondicionalmente e por ser um grande exemplo de força e determinação.

A minha amiga e comadre Patrícia por todo carinho, pela amizade, por ter sido quem me acolheu em Cascavel e me permitiu fazer parte da sua família, por ser um exemplo de integridade pessoal e profissional, por ter sido a pessoa que me incentivou a iniciar a especialização, o mestrado e o doutorado na UEL, com quem dividi horas de viagem e sempre foi um ombro amigo. Obrigada por torcer e acreditar em mim, não permitindo desanimar e desistir, pelas preciosas orações, pela confiança, pelo Pedro, pela Letícia e pelo Rogério que estão sempre em meu coração e pelo amparo, amor e dedicação a minha família em todos os momentos, especialmente aqueles em que estive ausente.

Aos meus amigos e compadres Ariana e Mauro pelo carinho, torcida, apoio emprestando o ombro em muitos momentos difíceis, por acreditarem muito em mim, por serem um grande exemplo, pelo amor dedicado ao Bê, pelas orações e mentalizações, pelo amparo à minha família em momentos que precisei ausentar-me e pelo maior tesouro que é a amizade.

Aos meus amigos e compadres Chris e Victor que acompanharam e torceram por este trabalho desde o início, pelo carinho e amizade em todos os momentos.

A todos os meus amigos e amigas de Cascavel, que felizmente são muitos o que dificulta nominá-los, que me incentivaram e me apoiaram sempre e por todo carinho dedicado a mim, ao Bê e ao Volnei.

A toda a minha família e à família do Volnei que sempre torceram pela conclusão deste trabalho.

A minha amiga Maike pelo carinho, amizade, por dividir alegrias e momentos não muito alegres durante o curso e na vida profissional, pela confiança em abrir caminhos profissionais e incentivo.

À Maria Claudete, que cuida do meu lar e da minha família com muita dedicação e carinho e que, ao seu modo, entende a importância deste trabalho.

Muito Obrigada, de coração...

A sorte não vem de fora. Nós mesmos criamos nossas oportunidades. As oportunidades parecem vir de fora, mas, na realidade, somos nós quem a criamos e as fazemos acontecer. Existe um ditado antigo: "Ocorrem situações auspiciosas na casa onde há virtudes acumuladas". Quem dedica amor ao próximo e trabalha para dar alegria aos semelhantes terá naturalmente oportunidades que lhe trarão muita alegria.

Do Livro Viver junto com Deus - A verdade em 365 preceitos - Masaharu Janiguchi - Seicho-No-Ie

Que no decorrer do meu caminho eu possa dedicar muito amor e dar alegrias aos meus semelhantes, da mesma maneira que recebi no desenvolvimento deste trabalho e em toda a minha vida....

Luciana B. M. Kottwitz

KOTTWITZ, Luciana Bill Mikito. ***Salmonella* spp.:** avaliação epidemiológica de surtos notificados no Paraná e caracterização de isolados epidêmicos e de origem avícola. 2009. 128 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) é o principal patógeno responsável por surtos de doenças transmitidas por alimentos de origem microbiana no Paraná. A vigilância epidemiológica de SE exige métodos eficazes para subtipagem e investigação da diversidade e origem genética dos isolados, considerando o elevado grau de homogeneidade genética deste sorovar. A utilização de técnicas de caracterização fenotípicas e genotípicas permite traçar a mobilidade deste sorovar numa população e entre diferentes espécies. O presente trabalho teve como objetivos analisar o perfil epidemiológico dos surtos de salmonelose notificados no Estado do Paraná de janeiro de 1999 a dezembro de 2008, avaliar a importância da cadeia produtiva de ovos na epidemiologia da salmonelose humana e realizar avaliação da diversidade fenotípica e genotípica de linhagens de SE epidêmicas e de origem avícola, isoladas neste Estado, entre 1999 e 2006. De acordo com os dados epidemiológicos, no período estudado, ocorreram 286 surtos de salmonelose, com 45,0% associados a alimentos a base de ovos, 34,8% a carnes e derivados e 20,2% a produtos classificados como alimentos variados: queijos, saladas, pudim, sorvetes, farofa, pavê e massas prontas. O sorovar prevalente foi Enteritidis, encontrado em 87,8% das cepas isoladas de pacientes e em 80,6% das cepas provenientes dos alimentos envolvidos nos surtos. SE PT4 foi o fagotipo prevalente. No entanto, no período estudado, foi possível verificar a diversificação dos fagotipos e, a partir de 2003 maior prevalência do fagotipo PT9. Do total de surtos analisados, 49,7% estiveram associados a reuniões familiares. Cinco mil ovos destinados ao consumo humano foram analisados, quatro mil foram obtidos em granja de postura comercial e mil ovos de descarte de incubação de matrizes de corte foram adquiridos em feiras livres e comércio informal. Em ovos provenientes de granjas de postura comercial, não houve isolamento de *Salmonella* spp. porém, em ovos de descarte de incubação obteve-se prevalência de 52% e o predomínio de SE (84,6%). Cepas de SE fagotipos PT4 e PT9 envolvidas em surtos de salmonelose ocorridos no período de 2002 a 2006, isoladas de casos esporádicos de salmonelose humana e obtidas de material de origem avícola, foram caracterizadas através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) com as enzimas *Xba I* e *Spe I*. Os resultados permitiram relacionar genótipos com a fagotipagem, evidenciado pela diferenciação entre cepas do fagotipo PT4 e PT9, bem como diferenciar cepas epidemiologicamente relacionadas das isoladas de pacientes com salmonelose e ainda evidenciar cepas provenientes da avicultura de corte como fontes de salmonelose humana no período estudado. A tipagem de 38 isolados de SE, provenientes de material biológico de reprodutoras destinadas à produção de frangos de corte, mostrou o predomínio dos fagotipos PT7 e PT9 e a caracterização molecular destas cepas, através da técnica PFGE permitiu a diferenciação inter e intra-fagotipo, essencial para investigações epidemiológicas de SE, visto que estas cepas apresentam pequena diversidade genética. A constatação de que as cepas de SE analisadas neste estudo

apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, alerta a possibilidade de falhas no tratamento clínico humano. Embora não tenha sido encontrada relação entre genótipos de PFGE e os padrões de resistência, a associação de ambas as técnicas possibilitou uma melhor caracterização de SE. Este estudo verificou a importância de SE nos surtos alimentares ocorridos no Estado do Paraná entre 1999 e 2008. A caracterização fenotípica e genotípica de isolados de SE epidêmicos e de origem avícola sugere que os produtos avícolas são a principal origem da salmonelose humana, no entanto com maior risco os produtos oriundos de matrizes reprodutoras de corte, especialmente ovos de descarte de incubação.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis. Salmonelose. *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). Resistência antimicrobiana. Fagotipagem.

KOTTWITZ, Luciana Bill Mikito. ***Salmonella* spp.:** epidemiological assessment of outbreaks reported in Paraná and characterization of isolated epidemics and from poultry origin. 2009. 128 f. Thesis (Doctorate in Food's Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar *Enteritidis* (SE) is the main pathogen responsible for foodborne outbreaks in Paraná. Epidemiological surveillance of SE requires effective methods for subtyping and investigation of genetic diversity and origin of isolated ones, considering that this serovar presents high degree of genetic homogeneity. The use of techniques for phenotypic and genotypic characterization allows to trace the mobility of this serovar in a population and between different species. This study aimed to analyze the epidemiological profile of outbreaks of salmonellosis reported in the State of Paraná from January 1999 to December 2008, evaluate the importance of the productive chain of eggs in the epidemiology of human salmonellosis and conduct the evaluation of phenotypic and genotypic diversity of SE epidemic strains of poultry origin, isolated in this State between 1999 and 2006. In that period, there were 286 outbreaks of salmonellosis, with 45.0% associated food made from eggs, 34.8% with meat and 20.2% with products classified as various food: cheese, salads, pudding, ice cream, *farofa*, and pastas. The serovar prevalent was Enteritidis, found in 87.8% of the strains isolated from patients and in 80.6% of the strains from foods involved in the outbreaks. SE phage type (PT) 4 was prevalent. However, in the period studied, it was possible to verify the diversification of the phage types and since 2003 a higher prevalence of PT9. From the total outbreaks examined, 49.7% were associated with family reunions. Five thousand eggs for human consumption were analyzed, four thousand were obtained from commercial farm and a thousand, hatching eggs of incubation from broiler breeders purchased in free markets and in the informal trade. There was no isolation of *Salmonella* spp. in eggs from poultry business. In hatching eggs of incubation were obtained a prevalence of 52.0% and the prevalence of SE (84.6%). Strains of SE PT4 and PT9 involved in salmonellosis outbreaks occurred from the period of 2002 to 2006, isolated strains from patients with salmonellosis and strains obtained from poultry material were characterized by the technique of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) with the enzymes *Xba I* and *Spe I*. PFGE was able to relate genotypes to phagetyping by differentiating the majority of the SE PT4 and PT9. Strains isolated from patients with salmonellosis could also be differentiated by the PFGE technique and it was also possible to observe that strains from broilers may have been sources of human salmonellosis in the period it was studied. The typing of 38 SE isolated from breeders' biological material intended for the poultry business presented the predominance of PT7 and PT9. The molecular characterization of these strains by PFGE, allowed to vary inter- and intra-phage type, that is essential for epidemiologic investigations of SE, which shows little genetic diversity. The characterization of 97 strains of *Salmonella* spp. obtained from biological material of broilers in the state of Paraná, from the period of 2002 to 2006, showed the prevalence of SE in 57.9% of the samples. In lower percentage, other five serovars were identified. Among the strains of SE probable to phagetype, there was a predominance of PT7 and PT9. The observation that the SE strains analyzed

in this study presented resistance to nalidixic acid, mainly strains of poultry origin, reinforces the need in reducing the selective pressure exerted by the use of quinolones in animal production. Although it has not been found relations between PFGE genotypes and patterns of resistance, the combination of both techniques allowed a better characterization of SE. This study verified the importance of SE in food borne outbreaks occurring in the State of Paraná between 1999 and 2008. The phenotypic and genotypic characterization of epidemic SE isolated and poultry origin suggests that poultry products may have been responsible for outbreaks of human's salmonellose in the that period, especially hatching eggs of incubation from broiler breeders.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis. Salmonellosis. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Antimicrobial resistance. Phage typing.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1 –** Fagotipos de *Salmonella* Enteritidis isolados de pacientes e alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Paraná entre janeiro de 1999 a dezembro de 2008.....62
- Tabela 2 –** Distribuição dos fagotipos PT4 e PT 9, de acordo com o alimento envolvido em surtos ocorridos no Paraná entre 1999 e 2008.63

ARTIGO B

- Tabela 1 –** Descrição das cepas de *Salmonella* Enteritidis analisadas, segundo fonte de isolamento, fagotipo, surto e região geográfica de origem.74
- Tabela 2 –** Distribuição das cepas de *Salmonella* Enteritidis conforme fagotipos, ano de isolamento e perfis de PFGE.....81

ARTIGO C

- Tabela 1 –** Distribuição e prevalência de *Salmonella* spp. em ovos destinados ao consumo humano, de acordo com a origem e método de isolamento.....93
- Tabela 2 –** Identificação dos sorovares e fagotipagem de SE de acordo com o método de isolamento e perfil de resistência antimicrobiana.....96

ARTIGO D

- Tabela 1 –** Distribuição das cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de material de origem avícola no Estado do Paraná, no período de 2002 a 2006, de acordo com os fagotipos identificados e o perfil de resistência antimicrobiana.105

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO B

- Figura 1 –** Dendrograma de similaridade genética entre as cepas de *Salmonella* Enteritidis PT4 e PT9, isoladas de alimentos (ALI), material biológico humano (BIO), ovos de descarte e material avícola (BIO AVES) envolvidos ou não em surtos ocorridos no Estado do Paraná, no período de 2002 a 2006. X1 a X16: diferentes perfis genéticos observados para as cepas analisadas, após digestão com endonuclease *Xba I*. A matriz de similaridade genética após PFGE com as endonucleases *Xba I* e *Spe I*, foram calculadas pelo coeficiente de Dice e os isolados agrupados pelo método UPGMA. CO: Região Centro Ocidental; M: Metropolitana; SO: Sudoeste; O: Oeste; NC: Norte Central.....79
- Figura 2 –** Dendrograma de similaridade genética entre as cepas de *Salmonella* Enteritidis PT4 e PT9, isoladas de alimentos (ALI), material biológico humano (BIO), ovos de descarte e material avícola (BIO AVES) envolvidos ou não em surtos ocorridos no Estado do Paraná, no período de 2002 a 2006. S1 a S16: diferentes perfis genéticos observados para as cepas analisadas, após digestão com endonuclease *Spe I*. A matriz de similaridade genética após PFGE com as endonucleases *Xba I* e *Spe I*, foram calculadas pelo coeficiente de Dice e os isolados agrupados pelo método UPGMA. CO: Região Centro Ocidental; M: Metropolitana; SO: Sudoeste; O: Oeste; NC: Norte Central.....80
- Figura 3 –** Padrões obtidos com cepas de SE PT4 e PT9 isoladas de alimentos, material biológico humano, ovos de descarte e material avícola envolvidos ou não em surtos ocorridos no estado do Paraná, no período de 2002 a 2006 após PFGE com as endonucleases de restrição *Xba I* e *Spe I*.84

ARTIGO D

- Figura 1** – Representação do coeficiente de similaridade obtido pela análise de amostras de SE através de PFGE.108
- Figura 2a** – Perfis genéticos obtidos para cepas de SE isoladas de material biológico de aves de corte, após PFGE com endonuclease de restrição *Xba I*.....109
- Figura 2b** – Perfis genéticos obtidos para cepas de SE isoladas de material biológico de aves de corte, após PFGE com endonuclease de restrição *Spe I*.....109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Ampicilina
CC	Região Centro Ocidental
CDC	Center of Disease Control and Prevention
CFX	Cefotaxima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CO	Região Centro Oriental
CS	Região Centro Sul
D	Poder Discriminatório
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ETA	Enfermidades Transmitidas por Alimentos
FAFLP	Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IAL	Instituto AdolfoLutz
kb	kilobases
LACEN	Laboratório Central do Estado
MM	Região Metropolitana
NaCl	Cloreto de sódio
NAL	Ácido nalidíxico
NC	Região Norte Central
NO	Região Noroeste
NP	Região Norte Pioneiro
OE	Região Oeste
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
pH	Potencial hidrogênio
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PT	Fagotipo

RAPD	Amplificação Randômica Polimórfica de DNA
REP	Sequências Palindrômicas Extragênicas de Bases Repetitivas
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de Restrição
SE	Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Enteritidis
RSE	Região Sudeste
SO	Região Sudoeste
SUT	Trimetoprim-sulfametoxazol
UBA	União Brasileira de Avicultura
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UT	Não-tipável

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	24
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
3.1 SALMONELLA SPP. EM AVES DE POSTURA COMERCIAL E EM OVOS	27
3.2 EPIDEMIOLOGIA DA SALMONELOSE HUMANA	32
3.3 SUSCETIBILIDADE DE SALMONELLA SPP. A ANTIMICROBIANOS	36
3.4 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SALMONELLA SPP	39
3.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DE SALMONELLA ENTERITIDIS	41
3.5.1 Métodos de Caracterização Fenotípica de Salmonella Enteritidis	41
3.5.2 Métodos de Caracterização Genotípica de Salmonella Enteritidis	43
3.5.3 Caracterização Molecular de Salmonella Enteritidis através da Técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1 ARTIGO A - AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE SURTOS DE SALMONELOSE OCORRIDOS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL, NO PERÍODO DE 1999 A 2008	52
4.2 ARTIGO B - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR PFGE E ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE SALMONELLA ENTERITIDIS PT4 E PT9 ISOLADAS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL	71
4.3 ARTIGO C - OVOS DE POSTURA COMERCIAL VERSUS OVOS DE DESCARTE DE INCUBAÇÃO: IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA	89
4.4 ARTIGO D - ESTUDO DA DIVERSIDADE CLONAL DAS LINHAGENS DE SALMONELLA ENTERITIDIS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PFGE, ASSOCIADA AO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E FAGOTIPAGEM	100
REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO

Salmonella é um dos mais importantes patógenos responsáveis por doenças transmitidas por alimentos em diversos países (ANDRIGHETO, 2006; GHILARDI et al., 2006; VAZ, 2007).

De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, *Salmonella* spp. foi responsável por 1.122 (23,8%) dos 4.716 surtos investigados no Brasil, no período de 1999 a 2005. No Estado do Paraná, 267 (43,8%) dos 609 surtos que ocorreram de 2000 a 2005 foram causados por este patógeno (GERMANO; GERMANO, 2008).

Dentre os sorovares não-tifóides, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) recebeu destaque no início da década de 90, quando passou a ser registrado em diversos continentes um aumento na incidência de infecções decorrentes do consumo de alimentos contaminados por este patógeno (VAZ, 2007; LAPUZ et al., 2007). No Brasil cepas de SE isoladas de amostras humanas e não humanas (alimentos, animais, ração, água, esgoto e ambiente) começaram a ser identificadas mais frequentemente a partir de 1993 (ANDRIGHETO, 2006).

Este patógeno possui vários reservatórios animais e apresenta habilidade de sobreviver e persistir no ambiente. No entanto, a associação dos surtos ao consumo de carne de aves e de ovos tem exigido da indústria avícola medidas constantes de controle da contaminação. SE ocupou, provavelmente, o nicho deixado pelos sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. A disseminação ocorreu porque a infecção por SE ocorre frequentemente sem manifestação clínica, o que dificulta o controle da infecção nas aves (VAZ, 2007).

Embora as salmoneloses ocorram frequentemente em humanos, a transmissão direta de pessoa a pessoa não é comum, sendo a maior parte das infecções associadas ao consumo de alimentos contaminados (TÉO; OLIVEIRA, 2005; SOUZA, 2008). Os alimentos de origem animal continuam a ser os principais responsáveis pela infecção humana (SILVA; DUARTE, 2002; AMSON et al., 2006), especialmente os produtos avícolas (WOO, 2005; RIBEIRO et al., 2007).

No Estado do Paraná, o ovo foi associado a 47,4% dos surtos de salmonelose ocorridos entre 1999 e 2004. O sorovar Enteritidis foi predominante

tanto nas amostras de pacientes (87,0%) quanto nas amostras de alimentos envolvidos nos surtos (89,8%) (ALCOCER, 2004).

Em um estudo realizado no Paraná com uma integração de postura comercial, *Salmonella* spp. foi isolada em oito (23,00%) das trinta granjas analisadas porém, não foi detectada nos ovos produzidos nessas granjas. Além disso, *S. Enteritidis*, que é o sorovar mais associado a salmonelose humana neste Estado, não foi isolado das granjas positivas. Assim, é possível que ovos produzidos em granjas inspecionadas e previamente higienizados ofereçam baixo risco à saúde pública. Entretanto, é necessário considerar o mercado “informal” de ovos de descarte, como também, os ovos caipira produzidos por pequenos produtores sem a higienização necessária e muitas vezes com a reutilização de embalagens (KOTTWITZ et al., 2008).

O Brasil é o sétimo produtor mundial de ovos e o segundo de carne de frango, com uma produção em 2008 aproximada de 27,0 bilhões de ovos e 10,2 milhões de toneladas de carne de frango. O Paraná, maior produtor de frango do país, produziu 2,5 milhões de toneladas de carne e 2,5 bilhões de ovos (IBGE, 2009).

A presença de *Salmonella* spp. torna qualquer alimento impróprio para o consumo humano (FORSYTHE, 2002). Portanto, a indústria avícola brasileira precisa controlar a ocorrência deste patógeno na cadeia de produção, com a finalidade de oferecer produtos inócuos ao consumidor, bem como evitar que barreiras comerciais dificultem ou limitem a exportação de seus produtos (VAZ, 2007).

Integrações avícolas que realizam pesquisas de monitoria de microrganismos patogênicos na cadeia de produção, geralmente não divulgam essas informações à comunidade científica, nem tornam seus dados públicos. Isso se deve provavelmente ao temor da publicidade negativa e potencial perda financeira que poderiam resultar da divulgação destas informações. Por isso, apesar da elevada incidência de *Salmonella* em aves no Brasil, ainda são poucos os dados publicados que mostram a sua disseminação em toda cadeia produtiva. São escassos também os dados a respeito do perfil genético de cepas isoladas de aves e produtos avícolas no Brasil (ANDRIGHETO, 2006).

A redução do nível de contaminação de produtos avícolas, envolve a identificação das fontes de contaminação e a implementação de programas de

controle eficazes (LIEBANA et al., 2001; WOO, 2005). Apesar da complexidade da cadeia produtiva, métodos que permitam rastrear o patógeno em todas as etapas de produção devem ser adotados. A rastreabilidade possibilita identificar a origem da contaminação, uma etapa essencial na investigação epidemiológica (VAZ, 2007).

A vigilância epidemiológica de SE exige métodos eficazes para subtipagem e investigação da diversidade e origem genética dos isolados (LIEBANA et al., 2001), considerando o elevado grau de homogeneidade genética deste sorovar (WEIDE-BOTJES et al., 1998; MURAKAMI et al., 2001; BOXRUD et al., 2007; ZHENG et al., 2007). A utilização de técnicas de caracterização fenotípica e genotípica permite traçar a mobilidade deste sorovar numa população e entre diferentes espécies e um melhor entendimento da sua epidemiologia (VAZ, 2007).

Diferentes métodos são utilizados para a caracterização das cepas de SE. Os métodos fenotípicos clássicos utilizados são a sorotipagem, a fagotipagem e a análise do perfil de resistência a antimicrobianos (WOO, 2005; ANDRIGHETO, 2006; BESSA, 2006; VAZ, 2007).

Embora amplamente utilizadas em investigação epidemiológica, as técnicas fenotípicas são limitadas pela possibilidade de alteração da expressão gênica ou pela predominância de determinados fagotipos, o que é freqüente em SE (VAZ, 2007).

Os métodos genotípicos complementam as técnicas fenotípicas em estudos epidemiológicos. Métodos moleculares de análise do DNA comumente utilizados incluem o perfil plasmidial, o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Random amplified polymorphic DNA – RAPD), a ribotipagem e a eletroforese de campo pulsado (Pulsed field gel electrophoresis – PFGE) (LACONCHA et al., 1998; AHMED et al., 2000; WOO, 2005).

Os principais critérios na escolha de métodos para tipificação de *Salmonella* spp. incluem a capacidade do método em tipificar todas as linhagens analisadas, a reprodutibilidade do ensaio e o poder de discriminação (OLIVE; BEAN, 1999).

Neste sentido, a macrorestrição de DNA cromossômico seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) é considerada a metodologia de referência para tipificação molecular de *Salmonella* spp. (MASLOW et al., 1993; LACONCHA et al., 1998; OLIVE; BEAN, 1999), sendo utilizada eficientemente na subtipagem de

cepas de SE (LIEBISCH; SCHWARZ, 1996; WEIDE-BOTJES et al., 1998; LACONCHA et al., 1998).

O presente trabalho teve como objetivo analisar o perfil epidemiológico dos surtos de salmonelose notificados no Estado do Paraná de janeiro de 1999 a dezembro de 2008. A importância da cadeia produtiva de ovos na epidemiologia da salmonelose humana foi avaliada, como também, a diversidade fenotípica e genotípica de linhagens de *Salmonella* Enteritidis epidêmicas e de origem avícola isoladas no Estado do Paraná, entre 1999 e 2006.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o perfil epidemiológico dos surtos de salmonelose notificados no Estado do Paraná de janeiro de 1999 a dezembro de 2008.
- Verificar a importância da cadeia de produção de ovos na epidemiologia da salmonelose humana, através da sorotipagem, fagotipagem, análise do perfil de resistência antimicrobiana e caracterização molecular através da técnica PFGE de cepas de *Salmonella* spp. e *S. Enteritidis* epidêmicas e isoladas de material de origem avícola.
- Avaliar a capacidade da técnica PFGE em caracterizar cepas de *S. Enteritidis* de diferentes fagotipos e de diferentes origens.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Salmonella é uma bactéria Gram-negativa em forma de bastão que pertence à família *Enterobacteriaceae*. São anaeróbios facultativos, produzem gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, apresentando flagelos peritríquios, com exceção de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, que são imóveis (FRANCO; LANDGRAF, 1996; GERMANO; GERMANO, 2001). Reduzem nitrato a nitrito, podem produzir sulfeto de hidrogênio, apresentam reação negativa ao indol, geralmente não produzem urease e lipase e, usualmente, não utilizam lactose (EL-GAZZAR; MARTH, 1992).

O gênero *Salmonella* é constituído pelas espécies *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie de *S. enterica* e a espécie de *S. bongori* são subdivididas em função de suas diferenças antigênicas. Assim, a espécie *S. bongori* agrupa 22 sorovares e as subespécies de *S. enterica* agrupam 1.504, 502, 95, 333, 72 e 13 sorovares, respectivamente. Uma terceira espécie, denominada *Salmonella subterraneae* foi reconhecida em 2005, porém ainda não foi incorporada na nomenclatura de *Salmonella* (SU; CHIU, 2007). O “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) sugere a utilização da forma abreviada, por exemplo, *Salmonella* Enteritidis ou *S. Enteritidis* (SE) para se referir *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis (BRENNER et al., 2000; ANDRIGHETO, 2006).

Salmonella está amplamente distribuída na natureza, sendo o trato intestinal do homem e de animais o principal reservatório natural (GERMANO; GERMANO, 2008). Entre os animais, as aves (galinhas, perus, patos e gansos) são o reservatório mais importante, seguido de suínos, bovinos, eqüinos, animais silvestres (roedores, pássaros, anfíbios e répteis) e animais de companhia, como cães e gatos. Porém, as aves desempenham um papel muito importante pela possibilidade de serem portadores assintomáticos, excretando continuamente *Salmonella* pelas fezes (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Embora todos os sorovares de *Salmonella* devam ser considerados como potenciais patógenos, aproximadamente 200 deles são responsáveis por

infecção em humanos e animais. Alguns poucos sorovares são adaptados a determinados hospedeiros, causando síndromes específicas. Os sorovares estritamente adaptados ao homem são *S. Typhi*, *S. Paratyhi A* e *S. Sendai*, responsáveis pela febre entérica ou febre tifóide. Os demais, denominados de ubiquários por infectarem tanto o homem como os animais, são comumente referidos como não-tifóides e causam, principalmente, gastroenterite (POPOFF; LE MINOR, 2005; TAVECHIO, 2006; GERMANO; GERMANO, 2008).

Vários sorovares de *Salmonella enterica* apresentam cerca de 90% de similaridade em seu DNA. Contudo, cada sorovar apresenta regiões específicas de inserções ou elisões, distribuídas em várias partes do cromossomo, cujos produtos dos genes podem estar envolvidos na habilidade peculiar de cada sorovar em infectar determinados hospedeiros (EDWARDS et al., 2002).

A salmonelose humana causada por sorovares não-tifóides, geralmente, ocorre como um episódio de enterocolite auto-limitada, com o desaparecimento dos sintomas em 4 a 10 dias após o início da doença. A manifestação clínica caracteriza-se por dor abdominal, náusea e diarreia aquosa, em 8 a 72 h após a ingestão do alimento contaminado. Ocasionalmente, pode-se observar a presença de muco ou traços de sangue nas fezes (D'AOUST, 1991; POPOFF; LE MINOR, 2005). A severidade e a duração dos sintomas depende, basicamente, do sorovar de *Salmonella* envolvido, dos fatores de virulência deste patógeno, do inóculo ingerido e da suscetibilidade dos indivíduos expostos (POPOFF; LE MINOR, 2005; TAVECHIO, 2006; GERMANO; GERMANO, 2008).

A dose infectante varia com a idade e a competência dos sistemas de defesa específicos e inespecíficos do indivíduo afetado, além das características do alimento e do sorovar de *Salmonella*. As doses infecciosas podem variar de 20 até 10^6 células por grama de alimento ou mL de água contaminada (FORSYTHE, 2002).

Uma ampla variedade de alimentos já foi associada à salmonelose humana e a prevalência de *Salmonella* em alimentos é extremamente variável (HAO et al., 1999). A maioria das infecções ocorre através da ingestão de alimentos de origem animal, principalmente carne de aves, ovos e derivados (RIBEIRO et al., 2007). Em menor proporção, outros alimentos são implicados em surtos, como leite e queijo não pasteurizados e carne bovina crua ou mal cozida contaminados.

3.1 *SALMONELLA* SPP. EM AVES DE POSTURA COMERCIAL E EM OVOS

As aves são os principais veículos de transmissão de *Salmonella* spp. e esse fato se deve, em grande parte, ao crescimento que ocorreu na indústria avícola da maioria dos países, dentro de uma visão econômica tipicamente de produção (HOFER et al., 1997).

As infecções por *Salmonella* em aves podem ser graves, como na pulorose (*S. Pullorum*) e no tifo aviário (*S. Gallinarum*), que implicam na maioria das vezes na eliminação dos lotes infectados. Entretanto, essa zoonose pode apresentar formas clínicas inaparentes, denominadas de infecções paratíficas. Essas infecções são responsáveis por uma queda da produtividade do plantel quando aparentes e propagam-se silenciosamente através da contaminação do ambiente (HOFER et al., 1997; CALIXTO et al., 2002).

A ração preparada com insumos de origem animal não tratados convenientemente, como as farinhas de carne, ossos, peixe, penas e vísceras, pode ser uma das fontes de introdução de *Salmonella* spp. no plantel avícola (HOFER et al., 1998).

Apesar de toda a ênfase dada ao problema da salmonelose são poucas as informações sobre os sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. O primeiro relato da ocorrência de SE em aves foi realizado por pesquisadores da Universidade de São Paulo em 1990. Até então, a identificação desse sorovar pelos principais centros de sorotipagem de *Salmonella* do país era muito baixo (SILVA; DUARTE, 2002).

Hofer et al. (1998) caracterizaram antigenicamente amostras de *Salmonella* spp. isoladas de matérias primas e ração para aves em 1976 e durante doze anos consecutivos (1979-1991). Os sorovares mais frequentemente identificados foram: *S. Montevideo*, *S. Senftenberg*, *S. Havana*, *S. Mbandaka*, *S. Tennessee*, *S. Infantis*, *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Cerro* e *S. Bredeney*. Neste período, SE foi encontrada em apenas 0,8% das cepas identificadas no setor de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro.

Em 1997, SE passou a ser isolada, com facilidade, de material avícola (SILVA; DUARTE, 2002). Zancan et al. (2000) relataram a frequência de *Salmonella* spp. em 83% de amostras de forro de caixa de entrega de pintinhos de

um dia, de matrizes pesadas e em 50% dos forros de poedeiras. O sorovar Enteritidis foi isolado em 40% das amostras de caixas de poedeiras.

SE predominou entre os sorovares isolados, entre 1994 e 1999, no Laboratório de Ornitopatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, SP (ANDREATTI FILHO, 2001). Esse sorovar correspondeu a 75,6% dos 45 sorovares isolados de aves nesse período.

Nos Estados Unidos, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* tem sido os principais responsáveis por infecções paratífóides em aves, depois dos sorovares Pullorum e Gallinarum (SILVA; DUARTE, 2002). SE não é um sorovar exclusivo de aves domésticas e como outros sorovares de *Salmonella* pode infectar um grande número de hospedeiros incluindo mamíferos, répteis e insetos (NAVARRO, 1995).

Normalmente, o oviduto das aves é estéril e os ovos não apresentam microrganismos na casca, na albumina e na gema. Entretanto, diversos autores têm relatado que o sorovar Enteritidis pode ser transmitido verticalmente (transmissão transovariana) (ALTEKRUSE et al., 1997; HOBBS; ROBERTS, 1999; KINDE et al., 2000; BERCHIERI JR et al., 2001; FORSYTHE, 2002), sugerindo uma adaptação da bactéria ao hospedeiro. Portanto, a contaminação interna de ovos intactos pode ser decorrente da infecção do sistema reprodutor (KANASHIRO et al., 2002).

Ovos também podem ser contaminados através do contato com o ambiente após a postura ou no momento da postura, durante o trânsito pela cloaca, por deposição e subsequente penetração do microrganismo através das estruturas da casca (KINDE et al., 2000; BERCHIERI JR et al., 2001; TÉO; OLIVEIRA, 2005). SE está disseminado amplamente e persiste na indústria avícola devido a esta capacidade de transmissão tanto vertical quanto horizontal (OKAMURA et al., 2001).

Pesquisas realizadas com ovos comerciais indicam que, geralmente, menos de 1% dos mesmos estão contaminados com SE. Mesmo em inoculações experimentais, quando as aves recebem inóculos de 10^6 a 10^8 UFC/mL por via intravenosa e oral, respectivamente, um número pequeno de células são detectadas, cerca de 10 por ovo (GAST; HOLT, 2000; KINDE et al., 2000). Porém, se ovos contaminados forem expostos a temperaturas adequadas, SE pode multiplicar, especialmente na gema (GRIJSPEERDT; HERMAN, 2003).

Alguns fatores intrínsecos presentes nos ovos parecem protegê-los, de maneira relativamente eficaz, da transmissão horizontal ou vertical. Esta pode ser

a explicação da baixa frequência de contaminação e do pequeno número de microrganismos encontrados em ovos. A cutícula (substância protéica que envolve o ovo quando este passa pela cloaca) que recobre a casca, a própria casca e suas membranas funcionam como uma barreira mecânica eficiente contra a invasão de microrganismos (JAY, 2000). Porém, os ovos são especialmente vulneráveis após os primeiros minutos da postura, antes que a cutícula seque e preencha parcialmente os poros da casca (BERRANG et al., 1999).

A penetração de microrganismos pode ser favorecida pela presença de rachaduras na casca, mesmo que microscópicas. Estas rachaduras podem aumentar em número e extensão quando os ovos são resfriados rapidamente (FAJARDO et al., 1995). Condições que provocam o umedecimento da casca também favorecem a penetração bacteriana em ovos (FAJARDO et al., 1995; BERRANG et al., 1999; JAY, 2000; OLIVEIRA; SILVA, 2000).

Uma vez que a penetração através das estruturas da casca aconteça, os microrganismos encontram, na clara, outras barreiras à sua sobrevivência e multiplicação. A lisozima, a avidina, a proteína ovoinibidor, a ovoflavoproteína, a ovotransferrina, além do pH que pode atingir valores em torno de 9,0, tornam a clara um ambiente desfavorável para a maioria dos microrganismos (HARA-KUDO et al., 2001; CHEN et al., 2001; COGAN et al., 2001). Porém, embora a clara não seja um ambiente favorável para o crescimento de *Salmonella*, a bactéria pode não só sobreviver neste local, como também multiplicar (HARA-KUDO et al., 2001).

O conjunto das características intrínsecas da clara inibe o crescimento de SE quando a transmissão ocorre por via horizontal. Entretanto, quando o ferro chega à clara vindo da gema ou quando a bactéria penetra na gema, pelo enfraquecimento da membrana vitelina, a multiplicação ocorre rapidamente (HARA-KUDO et al., 2001). Estes mesmos autores evidenciaram que, mudanças na composição da clara, durante o armazenamento, diminuem a eficiência dos mecanismos de defesa.

SE é mais resistente ao calor na gema do que no ovo inteiro e na clara. A variabilidade na inativação térmica nos diferentes produtos feitos à base de ovos é devido ao pH, atividade de água e natureza dos constituintes do produto. A adição de solutos tais como NaCl ou sacarose aumenta a resistência térmica de *Salmonella* (MICHALSKI et al., 1999). Além da matéria prima poder estar

contaminada é importante salientar que *Salmonella* pode apresentar respostas diferentes quando submetida a um mesmo estresse dependendo de fatores intrínsecos e extrínsecos. Portanto, a bactéria pode sobreviver a processamentos utilizados rotineiramente no preparo de alimentos dependendo do tipo de alimento.

Mudanças que ocorrem no ovo durante o armazenamento estão relacionadas às trocas gasosas entre o alimento e o ambiente realizadas através dos poros da casca. A clara perde água e dióxido de carbono, o que resulta em aumento do pH de cerca de 7,6 até 9,7, em velocidade dependente da temperatura. Em decorrência, ocorre ruptura da estrutura de gel da clara e a membrana vitelina perde sua resistência, o que leva a gema a um estado fluido e a uma posição descentralizada, podendo a mesma entrar mais facilmente em contato com os demais conteúdos do ovo (FENNEMA, 1996; JAY, 2000).

Em contraste com a clara, a gema não contém nenhum fator antimicrobiano (FORSYTHE, 2002), e apresenta um ambiente mais favorável para a bactéria, devido ao pH e ao conteúdo de lipídeos (CHANTARAPANONT et al., 2000 apud TÉO, 2002). A gema fresca apresenta valores de pH em torno de 6,0 variando muito pouco mesmo em condições de armazenamento prolongado (FENNEMA, 1996; JAY, 2000).

Mudanças na viscosidade da clara e na permeabilidade da membrana vitelina, devido ao envelhecimento do ovo, permite a migração da bactéria até a gema. A penetração na gema, através da membrana vitelina, de ovos contaminados experimentalmente é menor a 15°C, mas ocorre após 24 horas a 25°C. Uma vez na gema, *Salmonella* pode multiplicar, entre temperaturas de 10 a 25°C, sendo que o número de bactérias aumenta rapidamente a 25°C. Além disso, *Salmonella* pode estar naturalmente presente na gema devido à transmissão vertical. Embora a multiplicação na gema pareça ser bem menor quando a transmissão é horizontal, esta ocorre em níveis de risco ao consumidor (GAST; HOLT, 2000; GAST; HOLT, 2001a), demonstrando a importância das rotas horizontal e vertical na contaminação de ovos por *S. Enteritidis* (COX et al., 2000).

A contaminação de ovos por *Salmonella* spp. pode ocorrer durante o armazenamento e transporte (DUBBERT, 1987).

Hara-Kudo et al. (2001) observaram que, ovos contaminados com *S. Enteritidis* e armazenados a 7°C por 7 dias não apresentaram aumento do nível de contaminação, ao contrário do observado em armazenamento a 25°C pelo mesmo

período. Este fato ressalta que o crescimento de *Salmonella* em ovos, após a postura, depende da temperatura de armazenamento, evidenciando a importância deste fator extrínseco na prevenção do crescimento deste microrganismo. Uma vez que o nível de SE no ovo é baixo (entre 10 e 20 bactérias por ovo), mas que este número pode chegar a $10^4 - 10^8$ UFC por ovo após 24 horas de armazenamento a 25°C, uma das medidas práticas e efetivas para a redução dos riscos à saúde pública e o controle do crescimento de SE durante o armazenamento (HARA-KUDO et al., 2001; GAST; HOLT, 2001b).

Outro aspecto a ser observado é que, a baixa temperatura no interior do ovo reduz a possibilidade de penetração do microrganismo na gema, onde o mesmo poderia multiplicar mais rapidamente. A dificuldade de penetração de *Salmonella* até a gema, através da clara, devido à temperatura de armazenamento, fornece uma margem de segurança até que a gema seja resfriada a 7°C (GAST; HOLT, 2001b). Portanto, fica evidente que o número de células de *Salmonella* no ovo, sua localização e o tempo de permanência do alimento em temperaturas favoráveis à multiplicação determinam diretamente os riscos a que serão expostos os consumidores (GAST; HOLT, 2000).

Os ovos comerciais coletados na granja, na maioria das vezes, são enviados diretamente ao comércio, sem qualquer tratamento. Assim, os microrganismos presentes na casca podem encontrar condições de penetração durante a distribuição até o consumidor. A temperatura de multiplicação de *Salmonella* é de 8°C a 47°C e esta condição é comum, já que no Brasil os ovos comerciais não são refrigerados (SILVA, 1995).

Neste contexto, as iniciativas de controle, dos riscos potenciais oferecidos pelo consumo de ovos contaminados com *Salmonella*, visam a cadeia produtiva na sua totalidade e chegam, inclusive, ao consumidor. Assim, surgem como medidas eficazes a pasteurização do ovo (na casca), o resfriamento rápido, o armazenamento sob refrigeração e em atmosfera modificada (com dióxido de carbono) e medidas educativas e informativas direcionadas ao consumidor, entre outras (TÉO; OLIVEIRA, 2005).

3.2 EPIDEMIOLOGIA DA SALMONELOSE HUMANA

A salmonelose é considerada uma das zoonoses mais importantes e uma das principais doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (POPOFF; LE MINOR, 2005; TAVECHIO, 2006). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), sua importância deve-se ao número de pessoas afetadas anualmente e à consequente perda econômica decorrente do tratamento médico e ou hospitalar e da necessidade de reprocessamento e ou destruição de alimentos contaminados (KAKU et al., 1995).

Apenas um pequeno número de casos de enfermidades causadas por alimentos é notificado às agências de saúde dificultando, desta forma, o estudo epidemiológico destas doenças. A literatura estima que, para cada caso notificado, existem 136 casos na comunidade, ou seja, menos de 1,0% dos casos são notificados (WHEELER et al., 1999).

Nos Estados Unidos, as enfermidades transmitidas por alimentos acometem anualmente cerca de 76 milhões de pessoas, das quais 350 mil são hospitalizadas. Neste país estima-se que, a cada ano, ocorram 1,4 milhões de casos de salmonelose (VOETSCH et al., 2004; VAZ, 2007). Na Inglaterra no biênio 2001-2002, *Salmonella* spp. foi responsável por aproximadamente 31.000 casos de ETA, tendo sido superado apenas por *Campylobacter* (ANDRIGHETO, 2006).

No Brasil, o perfil epidemiológico de enfermidades transmitidas por alimentos é pouco conhecido, apenas alguns estados dispõem de Programas de Vigilância, estatísticas e levantamento de dados epidemiológicos sobre estes surtos (AMSON et al., 2006).

Apesar da obrigatoriedade da notificação de surtos de doenças transmitidas por alimentos, prevista nos Códigos Sanitários Municipais da maioria das cidades brasileiras, observa-se certo grau de negligência por parte dos serviços médicos assistenciais ao não notificar à vigilância sanitária a ocorrência de episódios desta natureza. Consequentemente, não é possível determinar com que magnitude estes problemas ocorrem. Esporadicamente, alguns surtos de toxinfecção alimentar são notificados em razão da gravidade ou do grande número de casos (GERMANO; GERMANO, 2001).

No Brasil, de acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, *Salmonella* spp. foi responsável por 23,8% dos 4.716 surtos investigados no período de 1999 a 2005. No Paraná, 43,8% dos 609 surtos que ocorreram entre 2000 e 2005 foram causados por este patógeno (GERMANO; GERMANO, 2008).

Os dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA divulgados no *Global Salmonella Surveillance* no Rio de Janeiro em setembro de 2005, mostram o predomínio de *Salmonella* Enteritidis entre os sorovares identificados no Brasil, no período de 2001 a agosto de 2005 (TOZETTO, 2006).

Desde 1993, o índice de notificação de salmonelose vem aumentando entre os surtos de ETAs no Rio Grande do Sul, sendo *Salmonella* spp. o agente prevalente no ano de 2000 (NADVORNY et al., 2004). Neste estado, dentre os surtos relatados no período de 1997 a 1999, *Salmonella* spp. foi identificada como causa de 35,7% dos mesmos, nos quais 2.846 consumidores foram acometidos e ocorreram 1.557 hospitalizações (COSTALUNGA; TONDO, 2002).

No Estado de São Paulo, surtos de ETAs causados por SE sofreram crescente aumento a partir de 1993. Em 1995, este sorovar passou a ser o de maior prevalência, com 64,9% dos isolamentos de material biológico de origem humana e 40,6% de outras origens (PERESI et al., 1998). No período de 1996 a 2003, SE foi identificada em 67,4% dos isolados de fonte humana, seguido por *S. Typhimurium* (5,2%) (FERNANDES et al., 2006).

Nos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Piauí, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo foram caracterizados 58 sorovares dentre as 5.686 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de aves, entre 1992 e 1996. Cinco sorovares predominaram: Enteritidis (61,7%), Heidelberg (8,3%), Hadar (4,5%), Typhimurium (2,3%), Infantis (2,2%) (NUNES, 1999). Corroborando com dados referidos anteriormente, os autores destacaram o aumento da incidência de *S. Enteritidis*, que ocupava o 4º lugar, em 1992, e passou a ser o sorovar mais frequente isolado a partir de 1993.

S. Enteritidis era raramente isolada de infecções humanas até o início de 1990. Um estudo realizado entre 1970 e 1990 no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo, mostrou que *S. Enteritidis* foi caracterizada em 0,37% e 0,85% das amostras analisadas de fontes humanas e não humanas, respectivamente. Porém, entre 1991 e 1995, houve uma mudança acentuada e a porcentagem de isolamento desse sorovar de amostras não humanas passou de zero para 40,7% (TAUNAY et

al., 1996). Um aumento de isolamentos ocorreu a partir de 1993, particularmente de ovos, aves (matrizes) e amostras do meio ambiente (SILVA; DUARTE, 2002).

Lirio et al. (1998) analisaram alimentos destinados à merenda escolar comprados pela prefeitura da cidade de São Paulo, entre 1992 e 1996, e observaram que 76,4% das amostras positivas para *Salmonella* eram amostras de frangos. *Salmonella* Enteritidis correspondeu a 70,6% dos sorovares isolados.

Santos et al. (2000) analisaram 150 carcaças de frangos congeladas de quatro marcas comercializadas em Jaboticabal, SP, durante 1996 a 1997. O estudo revelou a presença de *Salmonella* spp. em 32% das amostras analisadas, sendo que, 60,4% dos isolados pertenciam ao sorovar Enteritidis. Fuzihara et al. (2000) encontraram *Salmonella* spp. em 42% das amostras de carcaças de frangos oriundas de 60 pequenos abatedouros da cidade de Mauá, SP e 30% dos sorovares identificados eram Enteritidis. No norte do Paraná em 1999, *Salmonella* spp. foi isolada em 20,0% de carcaças de frango comercializadas em supermercados desta região (GASPARETTO et al., 2001).

No Brasil, embora carcaças de frango apresentem percentagem alta de contaminação, os ovos e seus derivados são os principais alimentos associados a surtos humanos (COSTALUNGA; TONDO, 2002; GEIMBA et al., 2004; GILLESPIE et al., 2005; TOZETTO, 2006; VAZ, 2007). Um estudo epidemiológico dos surtos de salmonelose notificados no Estado de São Paulo, entre o período de 1993 a 1997, demonstrou que todos estavam relacionados ao consumo de alimentos de origem avícola contaminados, sendo a maioria devido à utilização de ovos crus. Foi ainda evidenciada a alta capacidade de disseminação do patógeno através da contaminação cruzada durante o preparo dos alimentos (PERESI et al., 1998).

Em um estudo de 115 surtos alimentares por *S. Enteritidis* ocorridos entre 1995 e março de 2001 na região de Campinas, SP, que engloba 87 municípios, Simões et al. (2001) mostraram que ovos e seus derivados foram os principais responsáveis pelos surtos, destacando-se a maionese caseira com 57% dos casos, seguido pela cobertura de bolos com 15%.

Em São Paulo, SP, 23 cepas de *Salmonella* foram isoladas de alimentos envolvidos em 18 surtos ocorridos entre 1994 e 1997, sendo *S. Enteritidis* responsável por 69,6% desses surtos. Dentre aqueles em que Enteritidis foi o sorovar identificado, ovos ou produtos à base de ovos foram os alimentos predominantemente responsabilizados (62,5%) (JAKABI et al., 1999). Entre 1993 e

1997, Peresi et al. (1998) estudou 23 surtos de salmonelose na Região Noroeste do Estado de São Paulo. O sorovar Enteritidis fagotipo 4 foi identificado em todos os alimentos envolvidos, em 80,5% das coproculturas dos indivíduos afetados e em 41,7% dos ovos analisados.

Reis e Faria (1998) reforçaram a importância do ovo como veículo de *Salmonella*. Entre 1994 e 1997, no Distrito Federal, entre 112 amostras de alimentos envolvidos em 78 surtos de doenças transmitidas por alimentos, o ovo foi o segundo agente causal mais frequentemente identificado (11,6%), associado a molhos (principalmente de maionese) e a bolos com recheio e cobertura.

No Estado do Rio Grande do Sul, entre 1987 e 1998, *Salmonella* foi o principal agente etiológico dos surtos de doenças bacterianas de origem alimentar nos quais o agente etiológico foi identificado (52,2%) (SILVA JR, 2001). Com relação ao alimento mais envolvido, um levantamento dos episódios de toxinfecções alimentares ocorridos entre 1995 e 1996 mostrou que, 69,84% das amostras de *S. Enteritidis* foram isoladas em alimentos que continham ovos ou carne de frango em sua formulação (SANTOS et al., 2002).

Segundo Camargo (2001), no período de 1978 a 1999, no Estado do Paraná, 52,1% dos surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorreram em domicílios. Com relação ao alimento incriminado, entre 1993 e 1997, ovos foram os responsáveis por 75,8% dos surtos de salmonelose (CAMARGO et al., 1998); entre 1998 e 1999, estes alimentos foram incriminados em, pelo menos, 50% dos surtos dessa doença ocorridos no Estado (CAMARGO, 2001).

Avaliando os dados epidemiológicos de salmonelose no Estado do Paraná entre 1999 a 2004, Alcocer (2004) constatou que 47,4% dos surtos no período estudado foram causados por alimentos elaborados à base de ovos. O sorovar Enteritidis foi encontrado em 87,0% das cepas isoladas de paciente e em 89,8% das cepas provenientes dos alimentos envolvidos nos surtos.

As informações supracitadas indicam SE como freqüente agente causal de toxinfecções alimentares e associam este patógeno com produtos de origem avícola, especialmente ovos. A pequena disponibilidade, no Brasil, de informações oficiais sobre os sorovares, fagotipos e alimentos envolvidos nos surtos de salmonelose reforça a importância da coleta constante e da análise cuidadosa de dados epidemiológicos, para que seja conhecida a tendência da salmonelose nas diversas regiões do país. Assim, poderão ser planejadas pelo governo brasileiro

medidas higiênico-sanitárias e educativas eficientes para a prevenção desta doença (TÉO, 2002).

3.3 SUSCETIBILIDADE DE *SALMONELLA* SPP. A ANTIMICROBIANOS

As classes de antimicrobianos utilizados na prevenção ou no tratamento de infecções bacterianas em animais de produção foram por muito tempo as mesmas utilizadas em medicina humana (SCHWARZ et al., 2001).

Agentes antimicrobianos também tem sido utilizados em doses subterapêuticas em rações destinadas ao consumo de aves e outras espécies animais com o objetivo de melhorar seu crescimento e conversão alimentar (TESSI et al., 1997).

No entanto, o uso profilático de antimicrobianos, para promoção de crescimento e para tratamento de rebanhos pode, através da pressão seletiva, levar à seleção de linhagens resistentes que podem ser transferidas aos consumidores pelos alimentos (MOLBAK, 2004; VAZ, 2007), resultando em falhas no tratamento de pacientes e aumento da severidade das infecções ocorrem nos surtos causados por linhagens resistentes a antimicrobianos (ÂNGULO et al., 2004).

Com isso, o uso de antimicrobianos na agricultura e na área veterinária vem sendo discutido e medidas vêm sendo adotadas para reduzir a emergência de linhagens resistentes (CAPRIOLI et al., 2000; VAZ, 2007).

O uso de antibióticos como promotores de crescimento em frangos de corte e poedeiras até 16 semanas de idade é usual nos Estados Unidos e no Brasil (NUNES, 1999). A partir do ano de 2006, a União Européia impediu o uso de qualquer antimicrobiano como promotor de crescimento animal (VAZ, 2007). Estas medidas foram adotadas com o intuito de contribuir para a redução do surgimento de cepas bacterianas resistentes.

Durante anos, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol foram as drogas de escolha no tratamento de infecções graves por *Salmonella* mas, taxas crescentes de resistência a estes agentes foram reduzindo significativamente o seu uso na clínica médica (WINOKUR et al., 2000). Conseqüentemente,

fluorquinolonas e cefalosporinas de amplo espectro passaram a ser administradas nestes casos (MOLBAK et al., 2002).

Nos Estados Unidos, durante as duas últimas décadas, houve o surgimento de cepas de *Salmonella* multiresistentes. Cepas de *S. Typhimurium* DT104 (*defective type* 104) resistentes a diversas drogas, emergiram na década de 1990. Mais recentemente, surgiu a resistência a cefalosporinas de largo espectro entre cepas de *Salmonella* não-tifóides (GUPTA et al., 2003). Em 2000, o CDC e vários departamentos estaduais de saúde observaram o aumento da incidência do sorovar Newport, particularmente de cepas multiresistentes. Como a DT 104, estas cepas, conhecidas como Newport – MDRampC, são resistentes a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina, e ainda apresentam resistência adicional a amoxicilina/ácido clavulâmico, cefalotina e ceftiofur (CDC, 2000).

Em estudo recente nos Estados Unidos, foi constatado que a resistência antimicrobiana em cepas de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* estava associada com o aumento na frequência de bacteremias e hospitalização entre os pacientes analisados (TAVECHIO, 2006).

Ao contrário de outros sorovares de *Salmonella enterica*, até recentemente SE permaneceu sensível a maioria dos antimicrobianos (MOLBAK et al., 2002). No entanto, com a disseminação de SE na avicultura, os antimicrobianos passaram a ser utilizados de forma mais intensiva, visto que mascaram a infecção por este patógeno (SILVA; DUARTE, 2002). Com isto, recentemente vem sendo observado o aumento de cepas resistentes, principalmente em relação às quinolonas (VAZ, 2007).

No Brasil, diversos trabalhos têm investigado a resistência de *Salmonella* a antimicrobianos. Gasparetto et al. (2001), analisando 28 cepas isoladas de carcaças de frango comercializadas na Região de Londrina – PR, encontrou 3,57% de resistência à ampicilina e cefoxitina e 64,28% de resistência intermediária, principalmente frente à tetraciclina. Já o Instituto Oswaldo Cruz, avaliando, no ano de 2000, isolados de *Salmonella* de amostras de origem humana, alimentar, animal, ambiental e de matérias-primas de diversas regiões do país, encontrou 36,40% de isolados resistentes a pelo menos um antibiótico (COSTA et al., 2001 apud TÉO, 2002). Entretanto, Peresi et al. (1998), avaliando cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos e de pacientes envolvidos em surtos ocorridos na

Região Noroeste do Estado de São Paulo, entre 1993 e 1997, encontraram sensibilidade da maior parte dos isolados a todos os antibióticos testados.

Fernandes et al. (2003), em um estudo realizado no Estado de São Paulo, durante 1975 a 1995, com cepas de *Salmonella* Enteritidis enviadas aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública, Laboratórios de Patologia Animal e Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade de São Paulo, encontraram 67,7% das cepas susceptíveis a ceftazidina, cefoperazone e ciprofloxacina e mais de 90,0% susceptíveis a ampicilina, cefalotina, cloranfenicol, gentamicina, ácido nalidíxico e trimetoprim-sulfametoxazol. Resistência a um antibiótico foi encontrada em 24,8% das cepas analisadas e 8,5% foram multiresistentes.

Alcocer (2004) avaliou 317 cepas de *Salmonella* isoladas de pacientes associados aos surtos de salmonelose ocorridos no Estado do Paraná entre janeiro de 1999 a julho de 2004 e observou que 92,4% foram sensíveis a todos os antibióticos testados, 6,3% foram resistentes a um antibiótico, 0,3% a dois antibióticos, 0,6% a três antibióticos e 0,4% a quatro antibióticos. A resistência foi registrada principalmente para ácido nalidíxico porém, alguns isolados foram resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazol e gentamicina.

De forma geral, agências internacionais têm recomendado e incentivado o desenvolvimento de programas de monitoramento da resistência antimicrobiana, tanto em isolados de origem humana quanto animal. *Salmonella* tem sido adotado como o microrganismo indicador para estudos de resistência devido às suas características de ubiquidade e de importante agente de zoonoses (USERA et al., 2002).

A análise do perfil de resistência a antimicrobianos tem sido amplamente utilizada como uma informação adicional no processo de tipificação de linhagens bacterianas, e também constitui uma ferramenta de grande utilidade no monitoramento da emergência de linhagens resistentes.

3.4 VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE *Salmonella* spp.

A indústria avícola brasileira é altamente tecnificada e produtiva, ocupando uma importante posição econômica e social no país. O Brasil é o sétimo produtor mundial de ovos e o segundo de carne de frango, com uma produção em 2008 aproximada de 27,0 bilhões de ovos e 10,2 milhões de toneladas de carne de frango (IBGE, 2009). Considerando a posição destacada do país como maior exportador mundial de carne de frango em divisas e em volume (ANDRIGHETO, 2006).

Enquanto a exportação brasileira de ovos em casca apresenta excelentes resultados, o consumo *per capita* de ovos no Brasil, considerando a população brasileira em 184 milhões, está em torno de 131 ovos. Número considerado baixo quando comparado a países como o México com 375 ovos *per capita*, o Japão com 347 ovos e os Estados Unidos com 258 ovos (UBA, 2008).

Se por um lado a globalização da comercialização dos alimentos oferece benefícios e oportunidades, por outro apresenta novos riscos, como da transmissão de agentes infecciosos através das fronteiras (ANDRIGHETO, 2006). O mercado de consumo interno e externo vêm demonstrando crescente preocupação com a segurança dos alimentos, gerando demanda por produtos de origem animal com comprovada qualidade sanitária (FORSYTHE, 2002; VAZ, 2007). Desta forma, órgãos como *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS) têm se empenhado em desenvolver estratégias que permitam aos países garantir a segurança de alimentos (ANDRIGHETO, 2006).

A redução de *Salmonella* na indústria avícola passou a ser implementada com as medidas de prevenção e controle preconizadas pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola – PNSA (BRASIL, 1994). Contudo, a avicultura funciona num sistema amplo e complexo, o qual apresenta características próprias, que podem representar pontos críticos para a introdução de SE. Com o sistema de integração, linhagens do patógeno podem ser disseminadas, levando a um estado de contaminação persistente de difícil eliminação. Atualmente, a transmissão vertical tem sido reduzida, aumentando, portanto, a importância da transmissão horizontal em todas as etapas da cadeia de produção (VAZ, 2007).

Alguns fatores são considerados críticos na manutenção de SE ao longo da cadeia produtiva. A manutenção de lotes de reprodutoras positivas e aproveitamento de seus ovos para incubação, uso de antimicrobianos que minimizam as perdas produtivas e mascaram a infecção por *Salmonella*, contaminações cruzadas nos frigoríficos, onde a mistura de lotes de aves livres e infectados possibilita a disseminação do patógeno em diferentes pontos dos abatedouros, causando a contaminação do produto final, o mercado “informal” de ovos de descarte de incubação e ovos caipira comercializados por pequenos produtores sem a higienização necessária e muitas vezes com a reutilização de embalagens (SILVA; DUARTE, 2002; OLSEN et al., 2003; KOTTWITZ, 2005; VAZ, 2007). Por esta razão e pela falta de notificação de surtos de doença, a eliminação total de *Salmonella* é difícil e surtos de infecções alimentares causadas pelo consumo de produtos avícolas contaminados ainda são notificados no Brasil (PERESI et al., 1998; VAZ, 2007).

A redução do nível de contaminação de produtos avícolas, envolve a identificação das fontes de contaminação e a implementação de programas eficazes de controle (LIEBANA et al., 2001; WOO, 2005). Pela complexidade da cadeia produtiva, devem ser adotados métodos que permitam rastrear o patógeno em todas as etapas de produção, possibilitando o reconhecimento de sua origem, uma etapa essencial na investigação epidemiológica (VAZ, 2007).

A vigilância epidemiológica de SE exige métodos eficazes para subtipagem e investigação da diversidade e origem genética dos isolados (LIEBANA et al., 2001), considerando o elevado grau de homogeneidade genética deste sorovar (WEIDE-BOTJES et al., 1998; MURAKAMI et al., 2001; BOXRUD et al., 2007; ZHENG et al., 2007). Isto pode ser obtido com a caracterização das cepas isoladas, cuja similaridade ou diferença entre as linhagens permite inferir fontes de contaminação, além de identificar reservatórios naturais. Neste sentido, a utilização de técnicas de caracterização fenotípicas e genotípicas permite traçar a mobilidade deste sorovar numa população e entre diferentes espécies. Esta caracterização gera, portanto, um melhor entendimento da sua epidemiologia (VAZ, 2007).

Os principais critérios na escolha de métodos para tipificação de SE incluem a capacidade do método em tipificar todas as linhagens analisadas, a reprodutibilidade do ensaio e o poder de discriminação (HUNTER, 1990; OLIVE; BEAN, 1999). Este último é particularmente importante na caracterização de

bactérias clonais. Atualmente, o uso do índice de diversidade de Simpson (HUNTER, 1990) para avaliação da capacidade de discriminação de técnicas de caracterização é muito difundido (VAZ, 2007).

Neste contexto, foram criadas redes de investigação epidemiológica que visam agilizar a detecção de surtos de enfermidades transmitidas por alimentos e a adoção de medidas de controle ainda no decurso das mesmas, que incluem a salmonelose, através de ensaios moleculares padronizados, de modo a subtipificar o patógeno de maneira reprodutível e confiável.

Nos Estados Unidos, em 1993, foi criada a rede internacional de subtipificação molecular para a vigilância de enfermidades transmitidas por alimentos, a rede PulseNet, que padroniza a macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) empregada na tipagem de bactérias que podem ser transmitidas por alimentos. Devido ao êxito nos EUA, a rede PulseNet tem servido de modelo para implantação de grupos similares no Canadá e em países da Ásia e da América do Sul, constituindo a rede PulseNet internacional (SWAMINATHAN et al., 2001), da qual o Brasil é parte integrante.

Na Europa, o projeto Salm-gene apresenta os mesmos objetivos da rede PulseNet, padronizar procedimentos laboratoriais para tipificação de *Salmonella*, padronizar a análise dos resultados, além de armazenar os principais perfis em circulação, os quais devem ser disponibilizados em bancos de dados *on-line*. Assim, espera-se oferecer condições para a análise contínua dos resultados, maximizando a pesquisa e o controle dos surtos ainda no decurso dos mesmos (PETERS et al., 2003).

3.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO CELULAR E MOLECULAR DE *Salmonella* Enteritidis

3.5.1 Métodos de Caracterização Fenotípica de *Salmonella* Enteritidis

Os métodos fenotípicos clássicos utilizados como primeira diferenciação entre cepas do sorovar Enteritidis compreendem a fagotipagem e a

análise do perfil de resistência a antimicrobianos (WOO, 2005; ANDRIGHETO, 2006; VAZ, 2007).

Na fagotipagem determina-se a reatividade das culturas a um conjunto de fagos líticos (bacteriófagos) selecionados e em diluições apropriadas. Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias hospedeiras sensíveis, se replicam dentro das mesmas e provocam sua lise. O padrão de tipagem produzido divide as cepas do sorotipo em variantes resistentes ou sensíveis aos fagos (WARD et al., 1987; POPOFF; LE MINOR, 2005).

A técnica de fagotipagem apresenta algumas deficiências como a possibilidade de ocorrer a conversão de fagotipos e uma habilidade de tipar inferior a 100%, porque nem todos os organismos podem ser atribuídos a um fagotipo conhecido (LIEBANA et al., 2001). Outro inconveniente é que o método usualmente não pode ser conduzido em laboratórios convencionais (LANDERAS et al., 1998; ANDRIGHETO, 2006; BOXRUD et al., 2007)). Apesar de ser uma técnica muito útil para subdividir as cepas de *S. Enteritidis* de diferentes origens, a fagotipagem tem demonstrado discriminação insuficiente quando apenas um fagotipo predomina em determinada área geográfica (LIEBANA et al., 2001; FERNANDES et al., 2003; FERNANDES, 2004; WOO, 2005).

Alguns fagotipos (PTs) são mais estáveis e outros menos, contudo mudanças podem ocorrer como resultado da aquisição de plasmídios ou fagos (NUNES, 1999), mudanças na expressão de lipopolissacarídeos ou mutação espontânea afetando o conjunto de receptores de fagos (AHMED et al., 2000). Frost et al., (1989) relataram a conversão de cepas do PT4 para PT24, pela aquisição de um plasmídio de resistência (plasmídio R) à ampicilina, estreptomicina e tetraciclina, como também Hickman-Brenner et al. (1991) citam a conversão de cepas dos PTs 23 e 14b para PT8.

Outro método que pode ser utilizado para subtipagem, e que vem se tornando cada vez mais importante, é a análise do perfil de resistência a antimicrobianos (ANDRIGHETO, 2006). Além da utilidade como marcador epidemiológico, é uma ferramenta útil na identificação da emergência de linhagens resistentes. Os surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados sugerem a possibilidade de transmissão destas linhagens pela cadeia alimentar. Como consequência, ocorre o aumento de falhas no tratamento de pacientes e da severidade das infecções (ÂNGULO et al., 2004; VAZ, 2007).

Testes de sensibilidade a antimicrobianos compreendem ainda uma ferramenta útil na investigação epidemiológica de surtos. Contudo, o uso da técnica isoladamente para estudos epidemiológicos tem limitação devido às variações fenotípicas e à pressão seletiva à qual o patógeno está exposto. A resistência a antimicrobianos geralmente decorre da aquisição de genes de virulência carreados por plasmídeos ou transposons, transferidos entre linhagens da mesma espécie ou entre diferentes espécies. Na ausência de pressão seletiva, estes elementos podem ser perdidos. Assim, linhagens diferentes podem desenvolver padrões de resistência semelhantes, ao mesmo tempo que isolados pertencentes à mesma linhagem podem diferir no perfil de sensibilidade (ARBEIT, 2001 apud VAZ, 2007).

Técnicas fenotípicas são limitadas pela possibilidade de alteração da expressão gênica ou diante da dominância de determinados sorovares e fagotipos, o que é freqüente em SE e é influenciado pelo caráter clonal do patógeno (VAZ, 2007). Uma vez que, os isolados de SE são difíceis de subtipificar (CLARCK et al., 2005), os métodos tradicionais e os métodos moleculares devem ser associados para um estudo epidemiológico efetivo (FERNANDES et al., 2003).

3.5.2 Métodos de Caracterização Genotípica de *Salmonella* Enteritidis

Os métodos de tipagem genotípica ou molecular, os quais envolvem a análise direta do DNA de elementos genéticos cromossômicos ou extra-cromossômicos, permitem a diferenciação clonal de cepas. Um clone bacteriano pode ser definido como uma população de células apresentando muitas características idênticas, cuja explicação para esta identidade seria que todas as cepas se originam de um ancestral comum. Os métodos moleculares têm sido utilizados, principalmente, em combinação com métodos padrões bem estabelecidos, como a sorotipagem e a fagotipagem para finalidades epidemiológicas, permitindo a diferenciação de cepas epidêmicas das não epidêmicas (TAVECHIO, 2006).

O conhecimento dos clones de patógenos, a evolução de sua distribuição, incidência e prevalência espacial e temporária são subsídios importantes para o controle da doença e de seu agente. Essencial também é

estabelecer os reservatórios naturais dos clones e identificar as fontes de contaminação nos surtos e nos casos esporádicos (NUNES, 1999).

Métodos que pesquisam diferenças a nível molecular ganharam importância a partir dos anos 80. Porém, mesmo alguns desses métodos apresentam baixo poder discriminatório para o sorovar Enteritidis (Andrigheto, 2006). Esses métodos de tipagem moleculares apresentam muitas vantagens sobre as técnicas convencionais. Uma das mais importantes é que todas as bactérias são tipáveis; outro aspecto importante é que o poder discriminatório dos métodos baseados em análise de DNA é maior que o dos procedimentos fenotípicos (FARBER, 1996). Entretanto, nenhuma abordagem molecular combina reprodutibilidade e poder discriminatório com rapidez e simplicidade (FARBER, 1996; TENOVER et al., 1997).

A importância do desenvolvimento de marcadores moleculares para caracterizar cepas de *Salmonella* e relacionar os surtos com suas fontes de origem, em razão da prevalência de determinados fenótipos tem sido verificada. Entre os muitos métodos utilizados para determinar estes marcadores estão: a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”), a análise do perfil plasmidial (TAVECHIO, 2006), polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), *Fluorescent amplified fragment length polymorphism* (FAFLP), amplificação randômica polimórfica de DNA (RAPD), ribotipagem e o estudo genômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE – “Pulsed-field gel electrophoresis”) (TASSIOS et al., 1997; AHMED et al., 2000).

A Análise do perfil plasmidial envolve, inicialmente, a extração dos plasmídeos, moléculas circulares de DNA dupla-fita que se replicam autonomamente em uma célula bacteriana hospedeira. Eles variam em tamanho e contém genes que codificam resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência. Após a extração, os eventuais diferentes plasmídeos, presentes em cada amostra bacteriana, são separados por eletroforese em gel de agarose, determinando-se o número e o tamanho dos plasmídeos. Informação adicional pode ser obtida pela digestão do DNA plasmideal com enzimas de restrição e posterior comparação do número e tamanho de fragmentos resultantes, ou seja, análise do perfil de restrição plasmidial (TAVECHIO, 2006).

A subtipagem de SE através do perfil plasmidial é importante, já que, alguns plasmídios de *Salmonella* carregam genes responsáveis pelos fatores

virulência bacteriana (HELMUTH; SCHROETER, 1994). É um método tradicional usado em estudos epidemiológicos, porém, não é tão discriminatório como a fagotipagem para a subdivisão primária de um sorovar (FERNANDES et al., 2003). Este método também tem mostrado ser limitado para a subdivisão de SE PT4, visto que muitas cepas carregam um simples plasmídeo 38-Mda (RIDLEY et al., 1998, LUKINMAA et al., 1999).

O perfil plasmidial apresenta limitação inerente ao fato de que plasmídios são elementos extra-cromossomais que podem ser espontaneamente perdidos ou prontamente adquiridos. Consequentemente, isolados epidemiologicamente relacionados podem apresentar perfis plasmidiais diferentes (ARBEIT, 1999 apud VAZ, 2007).

Muitas das técnicas moleculares correntemente usadas para tipificação, baseiam-se na separação eletroforética de fragmentos de DNA. A eletroforese resultante é representada por um perfil de bandas sobre um gel. Visto que estes perfis resultantes são extremamente complexos, a facilidade de interpretação e a inter-relação dos resultados vão determinar se o método de tipagem terá utilidade na caracterização (OLIVE; BEAN, 1999).

A técnica RFLP – polimorfismo de fragmentos de restrição tem sido usada por anos para detectar e localizar sequências genômicas de uma variedade de organismos procaríotas e eucaríotas. Para a detecção de genes específicos, o DNA cromossomal é digerido por enzimas de restrição apropriadas, e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose são hibridizados com sondas específicas (OLIVE; BEAN, 1999). Para SE, tem sido usado principalmente IS 200 (HELMUTH; SCHROETER, 1994), porém a técnica é limitada pelo fato deste sorovar albergar um pequeno número de cópias IS200 (LIEBISCH; SCHWARZ, 1996; RIDLEY et al., 1998).

Fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) é uma variante da técnica de PCR original, usada para genotipagem de alta resolução de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. Estudos de FAFLP de SE previamente reportados mostraram eficiência na discriminação entre cepas dentro do mesmo fagotipo, a qual é necessária para análise de surtos e vigilância epidemiológica (SCOTT et al., 2001; DESAI et al., 2001).

Métodos recentemente desenvolvidos para ribotipagem de microrganismos, os quais usam as enzimas de restrição *Pst*I e *Sph*I (PS) têm mostrado serem úteis para subtipar fagotipos de SE, incluindo PT4 (CLARK et al., 2005). Ribotipagem resulta em um pequeno número de bandas, a qual simplifica a interpretação. Contudo, isto também limita a capacidade da técnica de distinguir entre cepas estreitamente relacionadas. A técnica pode ser aplicada com sucesso para diferenciar cepas de bactérias que manifestam alto grau de heterogenicidade dentro do operon rRNA (OLIVE; BEAN, 1999).

A amplificação randômica polimórfica de DNA (RAPD) é baseada no uso de curtas sequências (9 a 10 pares de base) de primers ao acaso, as quais hibridizam em baixa temperatura de anelamento com sequências de DNA cromossomal, dando início a amplificação de regiões do genoma bacteriano (OLIVE; BEAN, 1999; GUERRA et al., 2000). O número e a localização destes oligonucleotídeos iniciadores dispostos ao acaso varia para cepas de uma mesma espécie bacteriana (OLIVE; BEAN, 1999), sendo que alguns nucleotídeos são ferramentas úteis para evidenciar a diversidade genômica de *Salmonella* (GUERRA et al., 2000).

Embora diversos métodos para discriminação de SE tenham sido desenvolvidos e amplamente utilizados, muitos pesquisadores tem relatado que PFGE é a melhor escolha para análise de SE (WOO, 2005).

A técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE) é baseada na análise do genoma completo através da digestão por endonuclease de restrição e é, geralmente, considerada padrão para tipagem de *Salmonella* sendo muito útil na investigação de salmoneloses (GUERRA et al., 2000; BOONMAR et al., 1998). Para subtipar cepas de *Salmonella*, PFGE apresenta boa discriminação das cepas para alguns sorovares de *Salmonella*, incluindo *S. Enteritidis* (TSEN; LIN, 2001).

3.5.3 Caracterização Molecular de *Salmonella* Enteritidis através da Técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A macrorestrição do DNA cromossômico seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi primeiramente descrita em 1984 como uma ferramenta

para análise do DNA cromossômico de organismos eucarióticos (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

O método PFGE consiste na clivagem do genoma bacteriano com enzimas de restrição que reconhecem poucos sítios ao longo do DNA cromossômico, cortando-o aleatoriamente e gerando de 10 a 30 fragmentos de restrição que variam de 10 a 800 kb. Esses fragmentos grandes de DNA não podem ser separados por eletroforese convencional. Na eletroforese em gel de agarose em campo pulsado, a orientação do campo elétrico é modificada periodicamente, permitindo que fragmentos de até duas megabases sejam separados efetivamente por diferença de tamanho (TENOVER et al., 1997; GAUTOM, 1997; TOZETTO, 2006).

Para interpretar os perfis genéticos gerados pela técnica PFGE e utilizar esta informação para fins de estudos epidemiológicos, é necessário comparar os padrões PFGE e compreender que eventos genéticos ocorridos ao acaso, podem alterar estes perfis e diferenciar os isolados em quatro categorias: geneticamente indistinguíveis, estreitamente relacionadas, possivelmente relacionadas e não relacionadas epidemiologicamente. Essa diferenciação permite associar a origem e as rotas de transmissão de patógenos (TENOVER et al., 1995).

PFGE tem sido considerado o método “Padrão-Ouro” entre os diferentes métodos de tipagem molecular de várias espécies bacterianas (OLIVE; BEAN, 1999; LAPUZ et al., 2007) devido a sua utilidade na diferenciação de cepas patogênicas e no monitoramento de sua distribuição na comunidade (GAUTOM, 1997). PFGE tornou-se um método padrão entre laboratórios de saúde pública, devido à sua acurácia e reprodutibilidade (GAUTOM, 1997; GARAIZAR et al., 2000). Este método permite a diferenciação de isolados caracterizados como idênticos por outras análises como sorotipagem, fagotipagem, ribotipagem, análise de plasmídeos, entre outras. (MURAKAMI et al., 2001; LAPUZ et al., 2007).

Atualmente, PFGE é um dos métodos mais importantes utilizados na subtipagem de diversos microrganismos, inclusive *Salmonella* (WOO, 2005; ANDRIGHETO, 2006).

Pesquisas tem mostrado que PFGE é um método eficiente e estável na discriminação intra-sorovares (POWELL et al., 1994; TASSIOS et al., 1997; AHMED et al., 2000; NAUERBY et al., 2000).

A necessidade da utilização de métodos que apresentem capacidade de discriminação além de sorovares é reforçada pelo fato de alguns fagotipos de SE predominarem em determinadas regiões geográficas (LIEBANA et al., 2001) e pela observação de que, isolados de SE de um mesmo fagotipo podem apresentar diferenças em sua estrutura genômica e nas suas características de virulência (WEIDE-BOTJES et al., 1998).

Redes de vigilância epidemiológica de *S. Enteritidis*, entre elas PulseNet nos Estados Unidos, onde o Brasil está incluído (ZHENG et al., 2007), e Salm-gene/Enter-net na Europa (PETERS et al., 2003; FISHER, 2004), utilizam PFGE para caracterização de linhagens desse sorovar (VAZ, 2007).

Embora diferentes linhagens tenham sido associadas a surtos na Europa e EUA, acredita-se que *S. Enteritidis* tenha surgido da expansão clonal de um único isolado mais virulento, devido ao caráter epidêmico de sua ocorrência (HELMUTH; SCHROETER, 1994).

Devido à estabilidade dos perfis gerados e ao seu poder discriminatório, o método se mostra adequado para a criação de bases de dados, uma tendência atual na pesquisa epidemiológica (OLIVE; BEAN, 1999; LACONCHA et al., 1998). As bases de dados podem armazenar os perfis genéticos submetidos, permitindo um acompanhamento epidemiológico não apenas em escala regional, mas também a nível nacional ou internacional (SWAMINATHAN et al., 2001).

Embora linhagens de SE pertencentes ao fagotipo PT4 sejam consideradas extremamente homogêneas (STANLEY et al., 1991), diversas pesquisas têm afirmado a capacidade de diferenciação intra-fagotipos através de PFGE (POWELL et al., 1994; LIEBISCH; SCHWARZ, 1996; LUKINMAA et al., 1999; WOO, 2005; LAPUZ et al., 2007). A técnica é descrita como capaz de evidenciar diferenças menores entre clones, portanto adequada para uso como ferramenta de genotipificação (VAZ, 2007).

O poder discriminatório de PFGE tem sido verificado em cepas de um mesmo sorovar de *Salmonella* implicadas em surtos. Geralmente, todas as cepas epidemiologicamente relacionadas, ou seja, isoladas de diferentes fontes, porém, no mesmo período de tempo e local, apresentam perfil de restrição idêntico, refletindo clonalidade das cepas, independente da enzima de restrição utilizada na digestão do DNA cromossômico (TAVECHIO, 2006).

Na investigação de surtos de salmonelose, causados pelo consumo de alimentos contaminados, PFGE permite a determinação da relação entre os isolados de pacientes e de alimentos, auxiliando assim a identificação da fonte de contaminação (AHMED et al., 2000; MURAKAMI et al., 2001; VAZ, 2007). Através da técnica de PFGE, Nauerby et al. (2000) puderam relacionar a origem de surtos de salmonelose humana causados por fagotipos pouco frequentes, PT9a e PT11, analisando isolados obtidos de animais silvestres os quais se apresentaram genotipicamente indistinguíveis daqueles isolados humanos, identificando desta maneira a fonte de contaminação.

Matsuoka et al. (2004) demonstraram a estreita relação epidemiológica entre isolados de pacientes e a dieta enteral associada a um surto ocorrido em um hospital, através da análise PFGE.

Ainda, Lapuz et al. (2007) utilizando a mesma técnica, determinaram a correlação epidemiológica de isolados de SE presentes em ovos líquidos contaminados, rastreando a cadeia de produção destes alimentos.

A endonuclease *Xba* I é apontada em várias pesquisas como a enzima de restrição com maior poder discriminatório para cepas de SE (POWELL et al., 1994; RIDLEY et al., 1998; AHMED et al., 2000; NAUERBY et al., 2000; LIEBANA et al., 2001; WOO, 2005; CARDINALE et al., 2005; LAPUZ et al., 2007; ZHENG et al., 2007). A grande maioria dos trabalhos que envolvem a análise de SE por PFGE utilizam protocolos padronizados com esta enzima. Deste modo, é obtido um grau satisfatório de discriminação entre as linhagens e é possível comparar os perfis obtidos por diferentes grupos de pesquisa que utilizam o mesmo protocolo e as mesmas condições de macrorestrição e PFGE (VAZ, 2007). No entanto, a possibilidade de obter maior poder discriminatório é aumentada com a utilização de diferentes enzimas com sítios raros de restrição (FERNANDEZ et al., 2003; ZHENG et al., 2007).

O grau de polimorfismo genômico na população microbiana é um fator muito importante para epidemiologia molecular. A suposição da natureza clonal de alguns fagotipos de SE é um problema na escolha do método molecular a ser utilizado na discriminação de isolados. Como consequência, técnicas muito eficientes são necessárias para detectar pequenas diferenças no genótipo dos mesmos (LIEBANA et al., 2001). Em geral, PFGE é a técnica de escolha para muitas espécies microbianas, incluindo SE, por apresentar maior reprodutibilidade e maior

poder discriminatório. As dificuldades associadas a sua utilização são relacionadas ao custo do equipamento e do ensaio e o tempo necessário para a realização das análises (TENOVER et al., 1997; LIEBANA et al., 2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão apresentados nos artigos A, B, C, D e E que serão submetidos à publicação em revistas científicas:

Artigo A - Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no Estado do Paraná, Brasil, no período de 1999 a 2008.

Periódico: Acta Scientiarum

Artigo B- Caracterização molecular por PFGE e análise do perfil de resistência a antimicrobianos de *Salmonella* Enteritidis PT4 e PT9 isoladas no Estado do Paraná, Brasil.

Periódico: Journal of Medical Microbiology

Artigo C - Ovos de Postura Comercial *versus* Ovos de Descarte de Incubação: Implicações em Saúde Pública

Periódico: Revista Brasileira de Ciência Avícola

Artigo D - Estudo da diversidade clonal das linhagens de *Salmonella* Enteritidis através da técnica de PFGE, associada ao perfil de resistência a antimicrobianos e fagotipagem.

Periódico: Revista Brasileira de Ciência Avícola

4.1 ARTIGO A – AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DE SURTOS DE SALMONELOSE OCORRIDOS NO PERÍODO DE 1999 A 2008 NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Resumo

As informações sobre a prevalência dos sorovares e fagotipos de *Salmonella* envolvidos em surtos ocorridos no Estado do Paraná, Brasil são escassas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer o perfil epidemiológico dos surtos de salmonelose notificados neste Estado de janeiro de 1999 a dezembro de 2008. De acordo com os dados epidemiológicos obtidos no Laboratório Central do Estado (LACEN, Curitiba, Paraná) ocorreram 286 surtos de salmonelose com 4.949 pessoas expostas, 2.122 (42,9%) com manifestação dos sintomas da doença e 814 (16,4%) hospitalizações. Cinquenta e dois municípios (13,0%) notificaram surtos e Curitiba, município de maior população, apresentou a maior incidência com 90 surtos (31,5%). Entre os surtos analisados, 49,7% estiveram associados a reuniões familiares. Dos alimentos associados aos surtos, 45,0% foram alimentos a base de ovos, 34,8% carnes e derivados e 20,2% produtos classificados como alimentos variados. O sorovar prevalente foi Enteritidis, encontrado em 87,8% das cepas isoladas de pacientes e em 80,6% das cepas de alimentos envolvidos nos surtos. *Salmonella* Enteritidis PT4 foi o fagotipo prevalente. No entanto, no período estudado, foi possível verificar a diversificação dos fagotipos e a maior prevalência do fagotipo PT9, a partir de 2003.

Palavras-chave: Doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Salmonelose. *Salmonella* Enteritidis.

EPIDEMIOLOGICAL DATA OF *SALMONELLA* OUTBREAKS OCCURRED BETWEEN 1999 AND 2008 IN PARANA STATE, BRAZIL

Abstract

There is little information about the prevalence of *Salmonella* serovars and phage types associated to outbreaks occurred in Parana State, Brazil. The aim of this study was to perform an epidemiological evaluation of salmonellosis outbreaks notified from January 1999 to December 2008 in that State. According to epidemiological data obtained at the Parana Central Laboratory (LACEN, Curitiba, Parana) occurred 286 outbreaks of *Salmonella*. A total of 4.949 people were exposed, 2.122 (42,9%) became ill and 814 (16,4%) were hospitalized. Fifty-two cities (13,0%) notified *Salmonella* outbreaks and Curitiba, the most populated city, reported the highest rate with 90 outbreaks (31,5%). From the total number of outbreaks analyzed, 49,7% occurred at home. Egg-products were responsible for 45,0% of the outbreaks, followed by meat products (34,8%) and other foods (20,2%). The serovar Enteritidis

was prevalent and was identified in 87,8% of the strains isolated from the patients and in 80,6% provenient of food involved in the outbreaks. *Salmonella* Enteritidis PT4 was the prevalent phagotype. However, a phage type diversification occurred during the present study with the prevalence of phage type PT9 after 2003.

Keywords: Foodborne disease. Salmonellosis. *Salmonella* Enteritidis.

INTRODUÇÃO

A salmonelose é uma zoonose de grande importância em todo o mundo e apresenta-se como um desafio para a saúde pública em razão da elevada endemicidade, alta morbidade e, acima de tudo, pela dificuldade do seu controle (HOFER et al., 1997). A partir da década de 70, foi observado um aumento considerável e constante de surtos de salmonelose (HOUGUE, 2008).

Os sorovares e fagotipos de *Salmonella* spp. prevalentes variam geograficamente e ao longo do tempo (COX, 1995). Os mesmos veículos de transmissão estão envolvidos nos surtos ocorridos em diferentes países e em diferentes regiões de um mesmo país (GASPARETTO et al., 2001).

Os surtos de salmonelose humana causados por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) aumentaram acentuadamente a partir do final da década de 80, tornando-se um importante problema econômico e de saúde pública (MIYAMOTO et al., 1998; SANTOS et al., 2002). No Brasil, os surtos causados por esse sorovar aumentaram a partir de 1993 (SILVA JR, 2001; SILVA; DUARTE, 2002; PANALIMENTOS, 2008).

Segundo a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (2008) a intoxicação estafilocócica foi citada como a enfermidade transmitida por alimentos mais frequente. No entanto, a partir de 1995, o aumento da incidência de salmonelose alterou o quadro epidemiológico neste Estado (CAMARGO et al., 1999). O índice de notificação de surtos de salmonelose associados a alimentos no Rio Grande do Sul também aumentou a partir de 1993, sendo a doença prevalente no ano de 2000 (NADVORNY et al., 2004; SOUZA, 2008).

Embora a salmonelose seja a doença de origem alimentar mais frequente no Paraná, são poucas as informações sobre a prevalência dos sorovares e fagotipos de *Salmonella* envolvidos em surtos ou em casos esporádicos dessa doença.

Este trabalho foi realizado com o objetivo de conhecer o perfil epidemiológico dos surtos de salmonelose notificados no Estado do Paraná de Janeiro de 1999 a Dezembro de 2008, através das Fichas de Investigação Epidemiológica, que acompanharam cepas de pacientes e alimentos envolvidos nos surtos e encaminhadas ao Laboratório Central de Saúde Pública Estadual (LACEN), Curitiba, Paraná. Fichas de investigação de surtos notificados, porém sem amostras de alimentos ou pacientes para confirmação laboratorial também foram avaliadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados epidemiológicos dos surtos de salmonelose humana notificados no Paraná de Janeiro de 1999 a Dezembro de 2008 foram obtidos nos setores de Bacteriologia e Microbiologia de Alimentos do Laboratório Central do Estado (LACEN), Curitiba, Paraná.

A compilação de dados foi realizada mediante avaliação das Fichas de Investigação Epidemiológica dos surtos notificados pelas Regionais de Saúde dos Municípios paranaenses e das fichas de surtos concluídos epidemiologicamente, dos quais não foi realizada confirmação laboratorial.

Entre os 286 surtos notificados, 254 foram diagnosticados laboratorialmente e destes, a confirmação do sorovar foi realizada de trezentas e dez cepas de *Salmonella*. Cento e vinte e três cepas foram isoladas de pacientes e 187 de alimentos.

Em 119 dos 286 surtos foi possível realizar a análise laboratorial de alimentos associados aos mesmos. Considerando que, em 22 surtos houve a implicação de duas ou mais preparações alimentícias, foram obtidas 187 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos.

A identificação do sorovar e a fagotipagem do sorovar Enteritidis foi realizada no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia, do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Surtos de salmonelose ocorridos no Paraná entre 1999 a 2008

Dos 286 surtos ocorridos entre 1999 a 2008, 254 foram diagnosticados mediante confirmação laboratorial. Em 135 surtos o diagnóstico foi realizado após o isolamento de *Salmonella* spp. de material biológico de pacientes. Em 82 surtos realizou-se a confirmação através de análise do alimento e 37 surtos foram confirmados através de isolamento de *Salmonella* spp. de amostras de alimentos e de material biológico de pacientes envolvidos. Ainda, 32 surtos foram diagnosticados de acordo com o histórico de pacientes e alimentos, não sendo possível a sua confirmação laboratorial em virtude da impossibilidade de dispor de amostras biológicas ou de alimentos.

Neste período, 4.949 pessoas foram expostas a alimentos contaminados com *Salmonella* spp., sendo que 2.122 (42,9%) manifestaram os sintomas da doença e 814 (16,4%) foram hospitalizadas. Dos pacientes hospitalizados, foi registrado um óbito em abril de 2000 em Nova Cantu provocado pela ingestão de bolo contaminado por *S. Enteritidis* fagotipo PT 7. O bolo foi preparado caseiramente para uma festa paroquial na qual 100 pessoas foram expostas, 60 ficaram doentes das quais 38 foram hospitalizadas.

A distribuição anual do número de pessoas expostas, hospitalizadas e não hospitalizadas nos surtos revela que o maior número de doentes (406), assim como de hospitalizações (195), foi registrado no ano de 1999, seguido do ano de 2001 no qual 327 pacientes ficaram doentes e 118 foram hospitalizados. No ano de 2000, foram registrados 318 doentes e 101 hospitalizações. Em 2002, registrou-se a maior porcentagem de doentes (94,9%) em relação aos expostos do mesmo ano, seguido do ano de 2004 (90,5%) e do ano de 2005 (85,8%).

Em 2007, os doentes representaram 40,2% dos expostos e em 2008, 36,5%. Entretanto, o número de notificações de salmonelose reduziu consideravelmente nesses dois anos do estudo, sugerindo aumento da subnotificação neste período.

Municípios que notificaram surtos de salmonelose

No período de 1999 a 2008, 52 municípios (13,0%) dos 399 (IBGE, 2008) que compõe o Estado do Paraná notificaram surtos de salmonelose. Curitiba, município de maior população no Estado (1.797.408 habitantes), apresentou a maior incidência com 90 surtos (31,5%), seguida de Francisco Beltrão (72.409 hab.) com 17 surtos (6,0%), Cascavel (285.784 hab.) com 15 (5,2%), Toledo (109.857 hab.) com 11 (3,8%), Campo Mourão (82.530 hab.) e Paranaguá (133.559 hab.) com 8 (2,8%), São José dos Pinhais (263.622 hab.) e Pato Branco (66.680 hab.) com 6 (2,1%), União da Vitória com 5 (1,7%), Vera Cruz do Oeste, Jacarezinho e Londrina com 4 surtos (1,4%). Três surtos foram registrados em Bituruna, Colombo, Contenda, Cornélio Procópio, Nova Cantu e Irati e dois surtos em Apucarana, Campo Largo, Capitão Leônidas Marques, Enéas Marques, Guaratuba, Foz do Iguaçu e Santo Antônio da Platina. Os demais municípios notificaram um surto neste período.

Avaliação dos alimentos associados aos surtos de salmonelose humana ocorridos no Paraná entre 1999 e 2008.

Dos alimentos associados aos surtos, 45,0% (84) foram alimentos a base de ovos, 34,8% carnes e derivados (65) e 20,2% classificados como alimentos variados, tais como, queijos (1,0%), saladas (de tomate, repolho, couve, milho e ervilha) (4,8%), arroz cozido, extrato de tomate, fritas, mandioca, mousse, pudim, sorvetes, farofa, pavê e massas prontas (14,4%).

Considerando o ano de ocorrência, a implicação dos alimentos a base de ovos apresentou um pico em 2001 e, a partir de 2002, diminuiu gradualmente, registrando apenas um surto em 2008. Outros alimentos classificados como carne e derivados também estiveram implicados em um maior número de surtos a partir de 2001. Em 2003 e 2006, esta classe de alimentos superou os produtos a base de ovos no diagnóstico de surtos.

Quando foram estudados os tipos de preparações a base de ovos, 40 (21,4%) das 187 cepas analisadas foram isoladas de bolo, 38 de maionese (20,7%) e 6 de ovos (3,6%). O bolo foi um dos alimentos mais frequentes no período

de estudo, entretanto, a maionese superou este alimento em 2002 e no período de 2004 a 2008.

Na categoria de carnes e derivados, 39 (20,8%) pratos prontos a base de carnes suínas, bovinas e de aves e 26 (14,0%) diferentes embutidos frescos e defumados foram implicados nos surtos.

Estes resultados corroboram com Ribeiro et al. (2007) que afirmam a importância de alimentos de origem animal na cadeia alimentar humana, e que estes produtos podem representar uma importante fonte de patógenos associados a toxinfecções alimentares, como *Salmonella*, especialmente os produtos avícolas, reconhecidos como veículos mais frequentes de transmissão desse microrganismo.

Ainda, a observação de que os surtos apresentam a implicação de alimentos de origem avícola e de derivados de carne suína (embutidos), está de acordo com os relatos da literatura que descrevem a maior disseminação de *Salmonella* spp. em aves e suínos (GERMANO; GERMANO, 2008).

Ao investigar 116 surtos de salmonelose ocorridos no Rio Grande do Sul, no período entre 1997 e 1999, Costalunga e Tondo (2002) verificaram a associação de 2 ou mais preparações em alguns surtos e ainda que, alimentos contendo maionese e carnes representaram, respectivamente 42,45% e 16,55% dos mesmos.

Embora, o veículo de transmissão de *Salmonella* varie geograficamente, diversos autores relataram a implicação de produtos avícolas em surtos de salmonelose em todo mundo (PRAT et al., 2001; NUNES et al., 2003; FERNANDES et al., 2003).

Os resultados encontrados neste trabalho são compatíveis com o que tem sido observado em diferentes países. Patrick et al. (2004) ao avaliarem os surtos de salmonelose ocorridos nos Estados Unidos, no período de 1985 a 1999, observaram que 80,0% dos mesmos estavam associados a alimentos a base de ovos. Perales e Audicana (1989) relacionaram ovos e derivados com 90,0% dos surtos ocorridos na Espanha e, alguns anos mais tarde, a situação era semelhante na Itália, com ovos envolvidos em 60,2% dos surtos (FANTASIA; FILETICI, 1994). Da mesma forma, em diversos outros países, como Argentina, Estados Unidos, Holanda, Bélgica e Japão, *Salmonella* tem estado associada a alimentos elaborados à base de ovos (MURAKAMI et al., 2001), embora a porcentagem de contaminação

de ovos por este patógeno seja, aparentemente baixa, geralmente menor do que 1,00% (KINDE et al., 2000).

Estudos realizados na Albânia com ovos importados destinados à incubação mostraram que 1,26% das amostras analisadas estavam contaminadas com *Salmonella*, que foi isolada, exclusivamente, da casca dos ovos (TELO, 1999). Estes resultados podem conduzir à hipótese de que alimentos envolvidos em surtos tenham sido preparados com ovos descartados do processo de incubação e disponibilizados para comercialização (POPPE et al., 1998).

A casca do ovo deve ser considerada como um importante fator de risco para a contaminação de alimentos por *Salmonella* destacando a relevância da manipulação inadequada como possível fator de contaminação cruzada (PATRICK et al., 2004).

A evidente associação entre ovos e surtos de salmonelose levou países como Alemanha e Estados Unidos a determinar, oficialmente, algumas medidas preventivas na cadeia produtiva, a fim de minimizar o risco oferecido por estes alimentos à saúde pública (KIST; FREITAG, 2000; OLSEN et al., 2001). Neste sentido, a obrigatoriedade, a partir de 1993, do armazenamento de ovos sob refrigeração, inclusive durante a comercialização, parece ter conduzido a um decréscimo, na Alemanha, do número de casos da doença (KIST; FREITAG, 2000). Assim, as condições de armazenamento e manipulação, podem ser fatores determinantes da implicação deste alimento em surtos de salmonelose.

No Brasil diversos são os relatos implicando ovos em surtos de toxinfecções causadas por *Samonella*. Entre 1993 e 1997, Peresi et al. (1998) encontraram uma associação de 95,7% entre ovos e surtos ocorridos na Região Noroeste do Estado de São Paulo. No mesmo período, Camargo et al. (1998) relataram que ovos foram responsáveis por 75,8% dos surtos de salmonelose ocorridos no Paraná.

Quanto ao tipo de preparação à base de ovos envolvida em surtos, maionese tem sido a mais freqüente na Espanha (PERALES; AUDICANA, 1989), na Argentina (CAFFER; EIGUER, 1994) e no Brasil (HOFER; REIS, 1994). Porém, muitos autores têm relatado a implicação da preparação bolo nos surtos ocorridos no Brasil (REIS; FARIA, 1998; CAMARGO et al., 1998, SILVA JR, 2001).

A observação de diferentes preparações alimentícias estarem implicadas em surtos de salmonelose e a implicação de dois ou mais alimentos em

um mesmo surto, sugere procedimentos inadequados de manipulação que favorecem a contaminação cruzada. Esta constatação confirma o descrito por Cardoso e Tessari (2008) de que, embora produtos de origem avícola sejam os principais envolvidos em surtos de salmonelose, a manipulação desempenha um papel importante na disseminação da bactéria, por proporcionar a contaminação cruzada no ambiente de preparo de alimentos. A manipulação inadequada e o uso de matéria-prima sem inspeção também foram os fatores determinantes predominantes nos surtos que ocorreram no Rio Grande do Sul a partir de 1993 (NADVORNY et al., 2004; SOUZA, 2008).

Alguns autores descrevem que a falta de cuidados durante o preparo de alimentos contribui para a disseminação de *Salmonella* neste ambiente, devido a sua capacidade de aderir a superfícies, e pela possibilidade de formar biofilmes (AUSTIN et al., 1998; MATTICK et al., 2000, SOUZA, 2008).

Avaliação dos locais de ocorrência dos surtos

Os dados da avaliação do local de ocorrência correspondem somente a 151 surtos diagnosticados na Seção de Microbiologia de Alimentos do LACEN/PR e classificados segundo as orientações da Secretaria do Estado da Saúde do Paraná (2004).

Os domicílios foram os principais locais de ocorrência dos surtos (49,1%) seguidos das festas comunitárias (21,5%), refeitórios comerciais (20,9%), escolas (4,6%), refeitórios industriais (2,6%) e de hospitais (1,3%).

Este resultado é semelhante ao observado no Estado de São Paulo, onde a maior parte dos surtos de salmonelose ocorreu em domicílios, em 1996 e 1999 (SILVA JR, 2001). Camargo (2001) e Silva Jr (2001) também observaram um alto percentual de surtos de doenças transmitidas por alimentos em domicílios no Paraná (52,1%) e no Rio Grande do Sul (32,7%).

Costalunga e Tondo (2002) observaram a maior incidência (43,2%) de surtos de salmonelose em domicílios, ao investigarem 116 surtos ocorridos no Rio Grande do Sul entre 1997 e 1999.

As práticas empíricas de conservação e manipulação utilizadas em nível doméstico, quando empregadas na produção de maior quantidade de

alimentos pode justificar o alto percentual de surtos ocorridos em domicílios e em festas comunitárias. Este fato reforça a necessidade de informação sobre manipulação segura de alimentos à população em geral.

Sorovares de *Salmonella* relacionados a surtos no Paraná entre 1999 a 2008

Os resultados da sorotipagem das 310 cepas de *Salmonella* spp. associadas a 254 surtos mostram a prevalência do sorovar Enteritidis (83,3%). Das 123 cepas analisadas isoladas dos pacientes, cento e oito foram identificadas como SE (87,8%). Os sorovares London, Mbandaka, Newport e Oranienburg, representaram 5,8% dos sorovares isolados de pacientes.

Das 187 cepas de *Salmonella* isoladas de alimentos, cento e cinquenta cepas foram identificadas como Enteritidis, representando 80,6%. Os sorovares Agona, Albany, Branderup, Heidelberg, Pomona, Saintpaul e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* O:9;12:1 foram isolados somente de alimentos e representaram 6,2% destes isolados.

Os sorovares Anatum, Derby, Infantis, Johannesburg e Typhimurium foram identificados em amostras de alimentos e em amostras de pacientes.

Porcentagens elevadas de SE foram encontradas por Lírio et al. (1998) ao avaliarem os surtos ocorridos em São Paulo, SP, entre 1992 e 1996, onde SE foi o sorovar identificado em 70,6% dos alimentos analisados. Resultados reportados por Jakabi et al. (1999) e Peresi et al. (1998) mostraram que entre 1993 e 1997, SE foi o único sorovar isolado na região noroeste do Estado de São Paulo e na Capital. Em estudo epidemiológico realizado no Mato Grosso do Sul por Viana (2002) SE foi associado a 81,4% dos surtos veiculados, principalmente, com produtos de confeitaria, destacando-se o bolo confeitado. Ainda, no período de 1996 a 2003, Fernandes et al. (2006) identificaram SE em 67,4% dos isolados de fonte humana no Estado de São Paulo.

No início da década de 90, salmonelose humana causada pelo sorovar Enteritidis foi descrita como um grave e crescente problema nos Estados Unidos e em muitos países da União Européia (BARROW, 1993). Silva e Duarte (2002) sugeriram que há indícios da entrada de SE no Brasil via importação de

material genético avícola contaminado (IRINO et al., 1996; TAVECHIO et al., 1996) e que esse fato deve ter ocorrido no final da década de 80.

Porcentagens crescentes estão sendo registradas no Brasil desde o primeiro relato da ocorrência de SE em aves realizado por pesquisadores da Universidade de São Paulo (FERREIRA et al., 1990 *apud* SILVA; DUARTE, 2002). Levantamento realizado pelo setor de Enterobactérias da FIOCRUZ, Rio de Janeiro mostrou a presença de apenas 0,8% de SE entre as 2.293 cepas de *Salmonella* isoladas de matérias-primas e ração para aves entre 1976 e 1991 (HOFER et al., 1998). O Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, entre o período de 1970 a 1990 também mostrou que SE foi identificado em apenas 0,37% das 28.658 cepas de fontes humanas e em 0,85% das 14.345 cepas não humanas analisadas. Dados epidemiológicos do Instituto Adolfo Lutz mostram que no período entre 1991 e 1995, a porcentagem de isolamento de *S. Enteritidis* passou de 1,2% para 64,9% entre as amostras humanas e de zero para 40,7% para as amostras não humanas. No Estado do Paraná, em 1993, 7,1% dos surtos alimentares foram causados por *Salmonella* spp. e a partir de 1995, a incidência de salmonelose aumentou, sendo que, em 1998, 57,1% dos surtos confirmados laboratorialmente foram causados por essa bactéria (CAMARGO et al., 1998; CAMARGO et al., 1999).

Estes estudos ratificam que SE emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública no Brasil a partir de 1993 (FERNANDES et al., 2003, SILVA; DUARTE, 2002).

Fagotipagem no sorovar Enteritidis

Duzentas e cinquenta e oito cepas de SE isoladas de pacientes e alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2008 foram fagotipadas. Sete lisotipos foram definidos e o fagotipo PT4 foi prevalente (50,0%), seguido do PT9 (24,4%), PT1 (7,0%), PT7 (5,8%), UT (4,6%), PT6a (3,5%), e PT7a (0,8%) (Tabela 1). Esses sete lisotipos foram identificados nas cepas de SE isoladas de alimentos. Nas cepas isoladas de pacientes não foram identificados PT1 e PT7a.

Tabela 1 – Fagotipos de *Salmonella* Enteritidis isolados de pacientes e alimentos envolvidos em surtos ocorridos no Paraná entre janeiro de 1999 a dezembro de 2008.

Fagotipos	Pacientes	Alimentos	Total
	Cepas (%)	Cepas (%)	Cepas (%)
PT4	64 (59,2)	65 (43,3)	129 (50,0)
PT9	23 (21,3)	40 (26,7)	63 (24,4)
PT1	-	18 (12,0)	18 (7,0)
PT7	12 (11,2)	3 (2,0)	15 (5,8)
UT	8 (7,4)	4 (2,7)	12 (4,6)
PT6a	1 (0,9)	8 (5,3)	9 (3,5)
PT7a	-	2 (1,3)	2 (0,8)
NT*		10 (6,7)	10 (3,9)
Total	108 (100,0)	150 (100,0)	258 (100,0)

*Não Tipadas até a conclusão do trabalho

UT: Não-tipável

Ao considerar a distribuição geográfica dos lisotipos no Paraná, observa-se que a microrregião Metropolitana registrou a maior frequência de identificação de lisotipos com 36,8% das cepas, seguida da regiões Oeste (18,2%) e Sudoeste (11,6%). O lisotipo PT7a foi isolado somente na região Sudoeste.

Doze cepas não-tipáveis (UT) foram isoladas em quase todas as regiões do estado, exceto Norte Pioneiro, Centro Sul, Centro Ocidental e Noroeste. Dez cepas isoladas nas regiões Metropolitana e Oeste não puderam ser tipadas até a conclusão do presente trabalho.

Analisando a distribuição anual de fagotipos de SE, observa-se a diversificação de lisotipos em amostras de alimentos e de pacientes a partir de 2002 e 2003, respectivamente. No período de estudo, o fagotipo PT4 predominou entre as cepas de origem humana e de alimentos, no entanto observa-se maior prevalência do fagotipo PT9 em isolados de alimentos e de pacientes envolvidos em surtos, a partir de 2003.

Há uma variedade de fagotipos encontrados em diferentes estudos, porém cepas do fagotipo PT4 predominam em estudos feitos na Europa e no Brasil (ANDRIGHETO, 2006). Peresi et al. (1998) e Zancan et al. (2000) afirmam que o intercâmbio comercial de matrizes (bisavós) de aves com países da Europa pode ter facilitado a introdução e disseminação destas cepas no Brasil a partir de 1993.

Informações na literatura sobre ocorrência, origem, fontes de contaminação e disseminação de SE PT9 são escassas. Estudos mostram que alguns fagotipos tendem a predominar em determinadas regiões geográficas por um período de tempo (KARIUKY et al., 1999) e que a tipagem destas cepas é fundamental para detectar as mudanças epidemiológicas (GHILARDI et al., 2006).

Tabela 2 – Distribuição dos fagotipos PT4 e PT 9, de acordo com o alimento envolvido em surtos ocorridos no Paraná entre 1999 e 2008.

Categorias alimentícias	PT 4		PT9	
	Nº	%	Nº	%
1. PRODUTOS A BASE DE OVO				
Bolo	18	26,8	9	22,0
Maionese	13	19,4	9	22,0
Ovos	1	1,6	1	2,4
Subtotal	32	47,8	19	46,4
2. CARNES E DERIVADOS				
Pratos pronto à base de carne	19	28,3	3	7,3
Embutidos frescos e defumados	4	6,0	5	12,2
Subtotal	23	34,3	8	19,5
3. QUEIJOS	0	0	1	2,4
4. SALADAS	3	4,5	1	2,4
5. OUTROS	9	13,4	12	29,3
Subtotal	12	17,9	14	34,1
TOTAL	67	100	41	100

Considerando as amostras de alimentos, os fagotipos PT4 e PT9 predominaram em produtos a base de ovo (Tabela 2), sugerindo uma possível veiculação destes produtos em surtos de salmonelose causadas por estes fagotipos. No entanto, quando se consideram categorias alimentícias individuais, verifica-se uma maior predominância do fagotipo PT9 em produtos designados como “outros”, onde incluem-se os mais diversos alimentos preparados e prontos para o consumo (farofas, macarronadas, macaxeira, arroz, entre outros) o que implica na possibilidade de manipulação ou conservação inadequada, ou até mesmo

contaminação cruzada, fato este muito comum nas práticas domiciliares e industriais de preparo de alimentos.

O isolamento do fagotipo PT9 em produtos a base de ovos também evidencia a disseminação deste fagotipo através de ovos, carne de aves e seus derivados.

Cepas dos fagotipos PT1 e PT7 são pouco comuns no Brasil, porém podem ser derivadas do fagotipo PT4, por conversão (THRELFALL et al., 1993; LACONCHA et al., 1998; LING et al., 1998). Estes fagotipos também foram encontrados no presente estudo. Hickman-Brenner et al. (1991) indicam que o PT7a é um lisotipo derivado do PT7. O PT6a também deriva do PT 4 como foi demonstrado por Ridley et al. (1998)

A detecção de diferentes fagotipos entre as amostras pode indicar que as fontes de infecção das aves não se restringem à transmissão vertical, por exemplo, a partir das matrizes de origem européia.

A presença do PT4 e seus lisotipos derivados sugere a homologia de SE no Paraná, assim como, foi verificado previamente por Alcocer (2004) que caracterizou cepas de SE associadas a surtos ocorridos no Paraná, empregando REP-PCR e RAPD-PCR.

A fagotipagem tem sido tradicionalmente utilizada como primeira etapa para subdivisão do sorovar Enteritidis. Contudo, este método apresenta algumas limitações, tais como, a impossibilidade de todas as cepas serem tipadas com os fagos conhecidos, a possibilidade de ocorrer a conversão entre os fagotipos, a disponibilidade limitada de fagotipos o que leva a necessidade do método ser realizado em centros de referência e a não possibilidade de diferenciação na seqüência intra-fagotipo (WEIDE-BOTJES et al., 1998, LIEBANA et al., 2001, BOXRUD et al., 2007).

Considerando ainda que, os isolados de SE são difíceis de subtipificar (CLARCK et al., 2005), os métodos tradicionais e os métodos moleculares devem ser associados para um estudo epidemiológico mais adequado e conclusivo (FERNANDES et al., 2003).

CONCLUSÕES

A constatação de que 45,0% dos surtos de salmonelose ocorridos no período estudado foram causados por alimentos elaborados à base de ovos evidencia o risco potencial que este alimento pode representar para a saúde pública.

O sorovar prevalente foi Enteritidis, encontrado em 87,8% das cepas de pacientes e em 80,6% das cepas provenientes dos alimentos envolvidos nos surtos. No entanto, a partir de 2003, gradativamente, ocorreu a diversificação de sorovares isolados.

Salmonella Enteritidis PT4 foi o fagotipo prevalente, embora se observe a prevalência do fagotipo PT9 em isolados de alimentos e de pacientes envolvidos em surtos, a partir de 2003.

Do total de surtos analisados, 49,7% estiveram associados a reuniões familiares. Além disso, diferentes preparações alimentícias foram implicadas nos surtos, indicando a importância da contaminação cruzada na disseminação de *Salmonella*. Esses fatos sugerem que as ações da Vigilância Sanitária devem assumir um caráter educativo através de orientação e treinamento de Boas Práticas de manipulação de alimentos, tanto para trabalhadores de estabelecimentos comerciais quanto para manipuladores domésticos.

REFERÊNCIAS

ALCOCER, I. R. **Sorotipagem, Fagotipagem, Caracterização Molecular de Cepas de *Salmonella* spp. e Avaliação Epidemiológica de Surtos Ocorridos no Paraná de 1999 a 2004.** Londrina. 2004. 216 f. Tese [Doutorado em Ciência de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

ANDRIGHETO, C. **Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica.** São Paulo. 2006. 99 f. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

AUSTIN, J. W. et al. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella* Enteritidis biofilm formation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 162, p. 295-301, 1998.

BARROW, P. A. *Salmonella*: presente, past and future. **Avian Pathol.**, v. 22, p. 651-669, 1993.

- BOXRUD, D. et al. Comparison of Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 536-543, 2007.
- CAFFER, M. I.; EIGUER, T. *Salmonella* Enteritidis in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 15–19. 1994.
- CAMARGO, N. J. et al. **Surtos de 1978 a 1997**. Curitiba: Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária, 1998.
- CAMARGO, N. J. et al. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos em 1998**. Curitiba: Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, 1999.
- CAMARGO, N. J. Avaliação dos surtos de toxinfecção alimentar – Paraná – 1978 a 1999. In: SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 475 p.
- CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C. *Salmonella* na segurança dos alimentos. **Biológico**, v. 70, n. 1, p. 11-13, jan./jun. 2008.
- CLARK, C. G., M. et al. Emergence of *Salmonella* 4,5,12:i:- in Canada and characterization of the genetic events responsible. 2005. Disponível em: <http://www.cacmid.ca/abstracts_2005.htm>.
- COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, Brazil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 33, p. 342-346, 2002.
- COX, J. M. *Salmonella* enteritidis: virulence factors and invasive infection in poultry. **Trends Food Science Technology**, v. 6, p. 407-410, 1995.
- DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, **Tempe**, v. 26, p. 297-302, 1945.
- FANTASIA, M.; FILETICI, E. *Salmonella* Enteritidis in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 7–13. 1994.
- FERNANDES, S. A. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.
- FERNANDES, S. A. et al. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.
- GASPARETTO, K.M.P.O. et al. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças de frango e avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 22, n. 2, p. 185-199, 2001.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GHILARDI, A. C.R., TAVECHIO, A. T., FERNANDES, S. A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 281-286, May 2006.

HICKMAN-BRENNER, F. W.; STUBBS, A. D.; FARMER III, J. J. Phage Typing of *Salmonella* Enteritidis in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2817-2823, 1991.

HOFER, E.; REIS, E. M. F. *Salmonella* Serovars in Food Poisoning Episodes Recorded in Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 36, n. 1, p. 7-9, jan./fev. 1994.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de Sorovares de *Salmonella* Isolados de Aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 17 n. 2. abr./jun. 1997.

HOFER, E.; FILHO, S. J. S.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* Isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 18, p. 21-27, 1998.

HOGUE, A. **Risk assessment of microbiological hazards in foods: a global perspective**. Disponível em <<http://www.who.int/fsf/Micro/studycourse/allan/index.html>> Acesso em: 30 nov. 2008.

IRINO, K. et al. Progression of *Salmonella* Enteritidis Phage Type 4 Strains in São Paulo State, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, p. 193-196, 1996.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp. ocorridos na Grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

KARIUKI S. et al. Analysis of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium by phage typing, antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis. **J Med Microbiol** v. 48, p. 1037- 1042, 1999.

KINDE, H. et al. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. **Avian Diseases**, v. 44, p. 239-248, 2000.

KIST, M. J.; FREITAG, S. Serovar specific risk factors and clinical features of *Salmonella* enterica spp. enterica serovar Enteritidis: a study in South-West Germany. **Epidemiology and Infection**, v. 124, p. 383-392, 2000.

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

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

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**, Washington, v. 39, n. 1, p. 154-161, 2001.

LING, J.M. et al. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1693-1699, 1998.

LÍRIO, V. S. et al. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* Isoladas de Alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, p. 36-42, 1998.

MATTICK, K. L. et al. Habituation of *Salmonella* spp. at reduced water activity and its effects on heat tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 4921-4925, 2000.

MIYAMOTO, T. et al. *Salmonella* penetration through eggshell associated with freshness of laid eggs and refrigeration. **Journal of Food Protection**, v. 61, n. 3, p. 350-353, 1998

MURAKAMI, K. et al. Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. **Epidemiology and Infection**, v. 126, p. 159-171, 2001.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* spp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 47-51, 2004.

NUNES, I. A. et al. Phage Typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 2, p. 324-327, 2003.

OLSEN, S. J. et al. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 753-761, 2001.

PANALIMENTOS. SIRVETA. Disponível em:

http://www.panalimentos.org/sirveta/e/report_eta01.asp. Acesso em: 30 nov. 2008.

PATRICK, M. E. et al. *Salmonella* Enteritidis Infections, United States, 1985 – 1999, **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 1, 2004. Disponível em: <www.cdc.gov/eid>

PERALES, I.; AUDICANA, A. The role of hen's eggs in outbreaks of salmonellosis in north Spain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 8, p. 175-180, 1989.

PERESI, J. T. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

POPPE, C.; DUNCAN, C. L.; MAZZOCCO, A. *Salmonella* contamination of hatching and table eggs: a comparison. **Canadian Journal of Veterinarian Research**, v. 62, p. 191-198, 1998.

PRAT, S. et al. Tipificación fágica de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 9, n. 1, p. 7-12, 2001.

REIS, J. D. P.; FARIA, N. C. Surtos de toxinfecção alimentar ocorridos no Distrito Federal no período de 1994 a 1997. **Revista de Saúde Pública do Distrito Federal**, v. 9, n. 3, p. 27-31, jul./set. 1998.

RIBEIRO, A. R. et al. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Isolates, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, 2007.

RIDLEY, A. M.; THRELFALL, 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, n. 8, p. 2314-2321, 1998.

SANTOS, L. R. et al. *Salmonella* Enteritidis Isoladas de Amostras Clínicas de Humanos e de Alimentos Envolvidos em Episódios de Toxinfecções Alimentares, Ocorridos entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v. 16, n. 102/103, p.93-99, nov/dez, 2002.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DO PARANÁ. Doenças Transmitidas por Alimentos. 2008. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br>>. Acesso em: 15 dez. 2008.

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

SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SOUZA, R.B. **Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Avaliação Molecular da Resistência à Quinolonas de cepas de *Salmonella* epidêmicas e de origem avícola isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, Brasil.** 2008. 86 f. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos]- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

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

TELO, A. Occurrence of *Salmonella* spp. in imported eggs into Albânia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 49, p. 169-171, 1999.

THRELFALL, E. J. et al. Interrelationships between strains of *Salmonella* enteritidis belonging to phagetypes 4, 7, 7a, 8, 13, 13a, 23, 24 and 30. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, n. 1, p. 43-48, 1993.

VIANA, S.A. **Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, 1998 - 001**. Mato Grosso do Sul. 2002. Monografia [Escola de Saúde Pública " Dr. Jorge David Nasser"].

WEIDE-BOTJES, M.; KOBE, B.; SCHWARZ, S. Inter- and intra-phage type differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates using molecular typing methods. **Zentralbl. Bakteriol.**, Stuttgart, v. 288, p. 181- 193, 1998.

ZANCAN, F.T. et al. *Salmonella* spp. Investigation in Transport Boxes of Day-old Birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 230-232, 2000.

4.2 ARTIGO B – CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR POR PFGE E ANÁLISE DO PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE *Salmonella* Enteritidis PT4 e PT9 ISOLADAS NO ESTADO DO PARANÁ, BRASIL.

Resumo

Salmonella é a causa mais importante de doença de origem alimentar no Brasil, sendo o sorovar Enteritidis (SE) responsável pela maioria dos surtos. O objetivo deste trabalho foi caracterizar cepas de SE fagotipos PT4 e PT9 através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e da análise do perfil de resistência antimicrobiana. Um total de 41 cepas foram analisadas, sendo 26 isoladas de alimentos e pacientes envolvidos em surtos de salmonelose ocorridos no Estado do Paraná no período de 2002 a 2006, 4 de pacientes com salmonelose, 4 de alimentos envolvidos em surtos e 7 de origem avícola. Na análise do perfil de resistência antimicrobiana 41,5% das cepas foram resistentes ao ácido nalidíxico. Todas as cepas foram suscetíveis para os demais antimicrobianos testados. Os perfis obtidos com as enzimas *Xba I* e *Spe I* combinados mostraram a predominância do perfil X1S1, correspondente a 48,8% das cepas analisadas. As cepas de SE PT9 isoladas de surtos apresentaram elevada similaridade entre si, indicando alta correlação epidemiológica e possível clonalidade das mesmas. PFGE foi capaz de relacionar genótipos com a fagotipagem por diferenciar a maioria das cepas SE PT4 e SE PT9, como também, de diferenciar cepas isoladas de pacientes com salmonelose. As análises dos perfis de PFGE obtidos para as cepas analisadas sugerem que as cepas provenientes da avicultura de corte podem ter sido fonte de salmonelose humana no período estudado.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis. *Pulsed-field gel electrophoresis*. Salmonelose. Resistência antimicrobiana.

MOLECULAR CHARACTERIZATION BY PFGE AND ANALYSIS OF THE ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE FROM STRAINS OF *Salmonella* Enteritidis PT4 AND PT9 ISOLATED FROM OUTBREAKS OCCURRED IN THE STATE OF PARANÁ, BRAZIL FROM 2002 TO 2006.

Abstract

Salmonella is the most important cause of foodborne infection in Brazil and serovar Enteritidis (SE) has been responsible for most outbreaks. This study aimed to characterize strains of SE phage types PT4 and PT9 through the technique of Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and the analysis of the profile of antimicrobial resistance. A total of 41 strains were analyzed, having 26 of the patients isolated from food and patients involved in outbreaks of salmonellosis occurred in the state of

Paraná from 2002 to 2006 and isolated from sporadic cases of human salmonellosis, 8 patients with salmonellosis and 7 from avian origin. In the analysis of the antimicrobial resistance profile, 41.5% of strains were resistant to nalidixic acid. For all the others antimicrobials tested all strains were susceptible. The combined profiles obtained with the enzymes *Xba I* and *Spe I* the prevalence of the X1S1 profile, corresponding to 48.8% of the strains analyzed. The examined strains of SE PT9 presented high similarity between them, indicating high epidemiological correlation and possible clonality of them. PFGE was able to relate genotypes to phage typing highlighted by the differentiation between SE PT4 and SE PT9. Strains isolated from patients with salmonellosis could also be differentiated by PFGE and moreover, the analysis from the PFGE profiles, obtained for the analyzed strains, suggest the strains of broiler chicken as a source of human salmonellosis in the period studied.

Keywords: Salmonella Enteritidis. Pulsed Field Gel Electrophoresis. Salmonellosis. Antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

Salmonella é o patógeno mais frequentemente associado a doenças transmitidas por alimentos em diversos países (ANDRIGHETO, 2006). No Brasil, Salmonella também é a causa mais importante de infecção de origem alimentar. De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, Salmonella spp. foi responsável por 1.122 (23,8%) dos 4.716 surtos investigados no Brasil, no período de 1999 a 2005. No Estado do Paraná, 267 (43,8%) dos 609 surtos que ocorreram de 2000 a 2005 foram causados por este patógeno (GERMANO; GERMANO, 2008).

Os alimentos frequentemente implicados em surtos de salmonelose são de origem animal, principalmente carne de aves e ovos e seus derivados, devendo-se destacar a manipulação inadequada como um fator de contaminação cruzada (TÉO, 2002).

Segundo dados do Laboratório Central do Estado (LACEN), Curitiba, Paraná, alimentos a base de ovos foram associados a 45,0% dos surtos de salmonelose ocorridos neste Estado, no período de 1999 a 2008. O sorovar predominante foi Enteritidis tanto nas amostras de pacientes (87,8%) quanto nas amostras de alimentos envolvidos nos surtos (80,6%).

Diferentes métodos são utilizados para a caracterização de cepas de Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Enteritidis (SE). Métodos fenotípicos clássicos utilizados como primeira diferenciação entre cepas do sorovar Enteritidis

compreendem a fagotipagem e a análise do perfil de resistência a antimicrobianos (WOO, 2005; ANDRIGHETO, 2006; BESSA, 2006; VAZ, 2007).

A tipagem molecular de isolados bacterianos pela caracterização de proteínas ou ácidos nucléicos tem sido utilizada com sucesso para auxiliar as investigações epidemiológicas de surtos de doenças transmitidas por alimentos (SWAMINATHAN et al., 2001). A análise do perfil de macrorestrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE) é atualmente um dos mais utilizados na tipagem de *Salmonella*, devido ao seu excelente poder discriminatório, reprodutibilidade e estabilidade dos perfis (WOO, 2005). A diferenciação intersorovares é evidenciada por padrões de restrição próprios e relativamente uniformes (AHMED et al., 2000; LIEBANA et al., 2001; RIBOT et al., 2002; PETERS et al., 2003; FERNANDES et al., 2003).

O poder discriminatório da PFGE também tem sido verificado em cepas de *Salmonella* de um mesmo sorovar implicadas em surtos. Geralmente, as cepas epidemiologicamente relacionadas, ou seja, isoladas de diferentes fontes, porém no mesmo período de tempo e local, apresentam perfil de restrição idêntico, refletindo a clonalidade das cepas, independente da enzima de restrição utilizada na digestão do DNA cromossômico (TAVECHIO, 2006).

Este trabalho teve como objetivo caracterizar cepas de *Salmonella* Enteritidis fagotipos (PT) PT4 e PT9 através da técnica de eletroforese em campo pulsado (PFGE) e da análise do perfil de resistência antimicrobiana e estudar a correlação epidemiológica entre estas cepas analisando as características genéticas dos isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolados Bacterianos

Na Tabela 1 estão descritos fonte de isolamento, fagotipo, surto e região geográfica de origem das cepas de SE analisadas. As cepas epidêmicas e de pacientes com salmonelose foram fornecidas pelo Laboratório Central do Estado (LACEN), Curitiba, Paraná. As de origem avícola foram obtidas em um Laboratório de Sanidade Avícola credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e

Abastecimento (MAPA). A sorotipagem e a fagotipagem foram realizadas no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas.

Tabela 1 – Descrição das cepas de *Salmonella* Enteritidis analisadas, segundo fonte de isolamento, fagotipo, surto e região geográfica de origem.

Nº SURTO	Nº CEPA		PT	ANO ISOLAMENTO	FONTE DE ISOLAMENTO	REGIÃO DO ESTADO
	ALI	BIO				
S1 ¹	001	-----	4	2002	Maionese	Norte Central
S2 ¹	002	-----	4	2003	Lingüiça	Oeste
S3 ¹	003	-----	4	2003	Salame	Sudoeste
S4 ²	004	021	4	2003	Bolo	Centro Ocidental
S5 ²	005	022	9	2003	Milho conserva	Centro Ocidental
S6 ²	006	023	9	2003	Bolo	Centro Ocidental
S7 ²	007	024	9	2003	Maionese	Metropolitana
S8 ²	008	025	9	2004	Bolo	Sudoeste
S9 ²	009	026	9	2004	Bolo	Oeste
S10 ²	010	027	9	2004	Salpicão	Metropolitana
S11 ²	011	028	9	2004	Torta	Metropolitana
S12 ²	012	029	9	2004	Maionese	Sudoeste
S13 ²	013	030	9	2004	Chouriço	Sudoeste
S14 ²	014	031	9	2005	Bolo	Metropolitana
S15 ²	015	032	9	2005	Ovo com casca	Metropolitana
S16 ²	016	033	9	2006	Salame	Sudoeste
S17 ¹	017	-----	9	2006	Canudinho maionese	Metropolitana
Cepas de SE isoladas de pacientes com salmonelose	018	019	4	2002	Fezes humanas	Norte Central
	020	034	4	2003		Oeste
			4	2003		Sudoeste
			9	2006		Metropolitana
Cepas de SE provenientes de material de origem avícola	041		9	2002	Material biológico de matrizes de corte ³	NI*
	035		9	2003	Ovos de descarte	NI*
	036		9	2004	Ovos de descarte	NI*
	037		9	2006	Material biológico de matrizes de corte ³	NI*
	038		9	2006		NI*
	039		9	2006		NI*
	040		9	2006		NI*

¹Cepas de SE PT4 e SE PT9 isoladas apenas no alimento associado ao surto; ² Cepas de SE PT4 e SE PT9 isoladas do alimento e do paciente envolvidos no mesmo surto; ³ Material biológico de matrizes de corte: suabes de cloaca e órgãos; NI: Não identificado; ALI: cepa isolada de alimento; BIO: cepa isolada de fezes humanas; PT: fagotipo;

Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada através da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), 2006. Foram testados os antimicrobianos (OXOID[®]): ampicilina (10µg); cloranfenicol (30µg); ácido nalidíxico (30µg); cefotaxima (30µg); ciprofloxacina (5µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (25µg). Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em mm, com auxílio de paquímetro.

Análise do perfil de macrorestrição do DNA cromossômico através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A PFGE foi conduzida conforme protocolo proposto pelo "The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance" (PulseNet) (CDC, 1999).

Cada cepa bacteriana, obtida após 18h de incubação a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ em caldo tripticase de soja (TSB) (Becton, Dickinson and Company, USA), foi centrifugada a 3.000 rpm por 20 min. Após o descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspendido em 1 mL de tampão PBS e centrifugado a 14.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi novamente removido, adicionado de tampão PBS e agarose de baixo ponto de fusão 2 % (Ultra Pure Agarose Invitrogen, Brasil) com homogeneização em vortex. Essa mistura foi transferida para moldes para obtenção de pequenos blocos de gel de agarose contendo o DNA cromossômico, sendo 2 blocos por amostra dispensados em frascos individuais contendo 30µL de uma solução (20mg/mL) de proteinase K (USB Corporation) e 3 mL de tampão de lise celular (CLB; 50mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8, 1% sarcosil [Sigma]). O tratamento com a solução proteolítica foi repetido após 16-18 horas de incubação em banho-maria a 56°C . Cada bloco foi cortado, em pedaços de aproximadamente 2 mm. Dois destes pedaços foram submetidos, separadamente, à restrição com as enzimas *Xba* I e *Spe* I (1 µg/mL, Invitrogen, Brasil) e, em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C por 1h30min. Após a solidificação da agarose Seakem Gold a 1% realizou-se a montagem adequada dos blocos digeridos no pente.

Como marcador de massa molecular foi utilizado Lambda Ladder PFG marker (New England Biolabs, USA). O gel foi, então, submetido à eletroforese de campo pulsado no equipamento CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), nas seguintes condições: tempo inicial de pulso 5s; tempo final de pulso 45s; voltagem 200V (6V/seg); tempo de corrida 24h, ângulo 120°C e temperatura de 12°C. Após a eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio 1µg/mL (Pharmacia Biotech) por 30 minutos e descorado em água destilada por uma hora, com trocas da água a cada 20 minutos. Os fragmentos gerados pela restrição enzimática foram visualizados em luz UV e documentados.

Análise dos resultados

A análise dos géis foi realizada utilizando o software Gel-Pro Analyzer 4.0, que gera, por comparação com o padrão de massa molecular, tabelas com os pesos dos fragmentos em análise. As tabelas foram exportadas para o software Microsoft Office Excel 2003, compiladas e organizadas, gerando uma planilha codificada para a presença ou ausência de bandas através da numeração 1 e 0, respectivamente.

A análise da similaridade entre os perfis encontrados foi realizada utilizando o programa NTSYS 2.02. O coeficiente escolhido foi o de DICE (1945) e o método de agrupamento foi o UPGMA (média das distâncias – *average linkage clustering*) para geração dos dendrogramas.

O poder discriminatório (D) de cada método foi calculado com base no índice de diversidade de Simpson (SIMPSON, 1949), conforme proposto por Hunter (1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A vigilância epidemiológica exige métodos eficazes para tipagem de SE e investigação da diversidade e origem genética dos isolados (LIEBANA et al., 2001), pois este sorovar apresenta elevado grau de homogeneidade genética (WEIDE-BOTJES et al., 1998; MURAKAMI et al., 2001; BOXRUD et al., 2007;

ZHENG et al, 2007). Neste contexto, a combinação de endonucleases com elevado poder discriminatório para SE evitam dificuldades na interpretação da clivagem com enzimas de restrição específicas (LIEBISCH; SCWARZ, 1996).

No presente estudo foram empregadas as endonucleases *Xba I* e *Spe I* que possuem ótimo poder discriminatório para SE (LIEBISCH; SCWARZ, 1996; RIDLEY et al., 1998; WEIDE-BOTJES et al., 1998; NAUERBY et al., 2000; MATSUOKA et al., 2004).

A análise dos resultados obtidos na PFGE, com a enzima *Xba I*, para as 41 cepas de SE permitiu identificar 16 perfis genéticos, que foram designados como Xn, onde n corresponde ao número indicativo de cada perfil. Foram observados entre 10 e 18 fragmentos com peso molecular entre 48,5kb e 533,5kb para os perfis de PFGE. Da mesma forma, a enzima *Spe I* também discriminou 16 perfis, designados como Sn, porém o número de fragmentos variou de 12 a 20 e o peso molecular de 48,5 kb a 485,0 kb.

O perfil X1 foi predominante na digestão com *Xba I*, observado em 24 dos 41 isolados (58,5%) (Fig. 1). Na restrição com *Spe I*, também o perfil correspondente ao S1 foi predominante, encontrado em 25 cepas (61,0%) (Fig. 2). O poder discriminatório (D) das enzimas *Xba I* e *Spe I* no presente estudo foi 0,661 e 0,633, respectivamente. Os perfis obtidos com as duas enzimas combinadas mostraram a predominância do perfil X1S1, presente em 20 cepas (48,8%). Com isso, o poder discriminatório aumentou para D = 0,768, maior em relação ao obtido com cada enzima isoladamente. A Tabela 2 mostra a distribuição das 41 cepas conforme fagotipo, perfil de PFGE e ano de isolamento das cepas.

Em relação ao poder discriminatório, os resultados obtidos neste trabalho corroboram com Liebisch e Schwarz (1996) que usaram PFGE para analisar 31 cepas de SE isoladas de material avícola na Alemanha e, pela combinação dos dados de *Xba I* e *Spe I*, encontraram D = 0,88. Weide-Botjes et al. (1998) também analisaram com *Xba I* e *Spe I* cepas de SE isoladas na Alemanha, observando D= 0,709 e D=0,702, respectivamente. Laconcha et al. (2000) durante a análise de 101 cepas de SE isoladas de animais, alimentos e humanos em três países europeus, também observaram D elevado quando os resultados com as endonucleases *Xba I* e *Spe I* foram combinados. Em contrapartida Andrigheto (2006) observou baixo poder discriminatório (D = 0,301) ao realizar a macrorestrição com

as endonucleases *Xba I* e *Spe I* de 108 cepas de SE isoladas em uma cadeia de produção avícola no Brasil.

A análise dos resultados da presente pesquisa demonstra que as cepas de SE PT9, isoladas de amostras humanas e de alimentos no período de 2003 a 2006, apresentam elevada similaridade (≥ 0.90), e portanto são epidemiologicamente relacionadas. Similarmente, as cepas de SE PT4 isoladas no Surto 4, de paciente e alimento, 004 e 021, respectivamente, também apresentaram similaridade ≥ 0.90 , indicando correlação epidemiológica (Fig. 1).

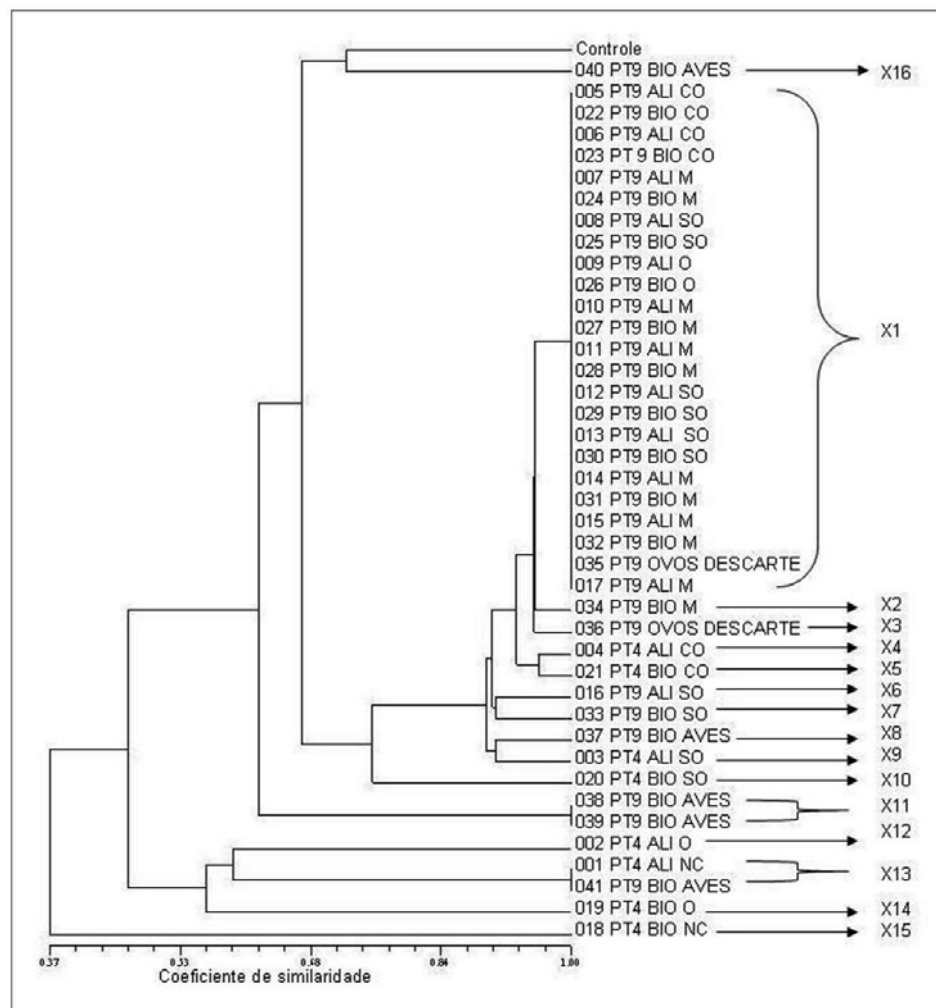


Figura 1 – Dendrograma de similaridade genética entre as cepas de *Salmonella* Enteritidis PT4 e PT9, isoladas de alimentos (ALI), material biológico humano (BIO), ovos de descarte e material avícola (BIO AVES) envolvidos ou não em surtos ocorridos no Estado do Paraná, no período de 2002 a 2006. X1 a X16: diferentes perfis genéticos observados para as cepas analisadas, após digestão com endonuclease *Xba I*. A matriz de similaridade genética após PFGE com as endonucleases *Xba I* e *Spe I*, foram calculadas pelo coeficiente de Dice e os isolados agrupados pelo método UPGMA. CO: Região Centro Ocidental; M: Metropolitana; SO: Sudoeste; O: Oeste; NC: Norte Central.

No Surto 5, ocorrido em 2003, apenas a cepa SE PT9 do paciente 022 apresentou perfil diferente do encontrado para as demais cepas submetidas a restrição com *Spe I*. No entanto, em relação as cepas isoladas do alimento (005) e do paciente (022), a diferença foi de apenas 3 fragmentos (dados não apresentados), sugerindo a existência de correlação epidemiológica. Sob este aspecto Tenover et al. (1995) comentou que isolados são considerados estreitamente relacionados se o padrão PFGE difere por mudanças compatíveis com

uma única alteração genética, isto é, uma mutação de ponto que resulta em diferenças em 2 ou 3 bandas.

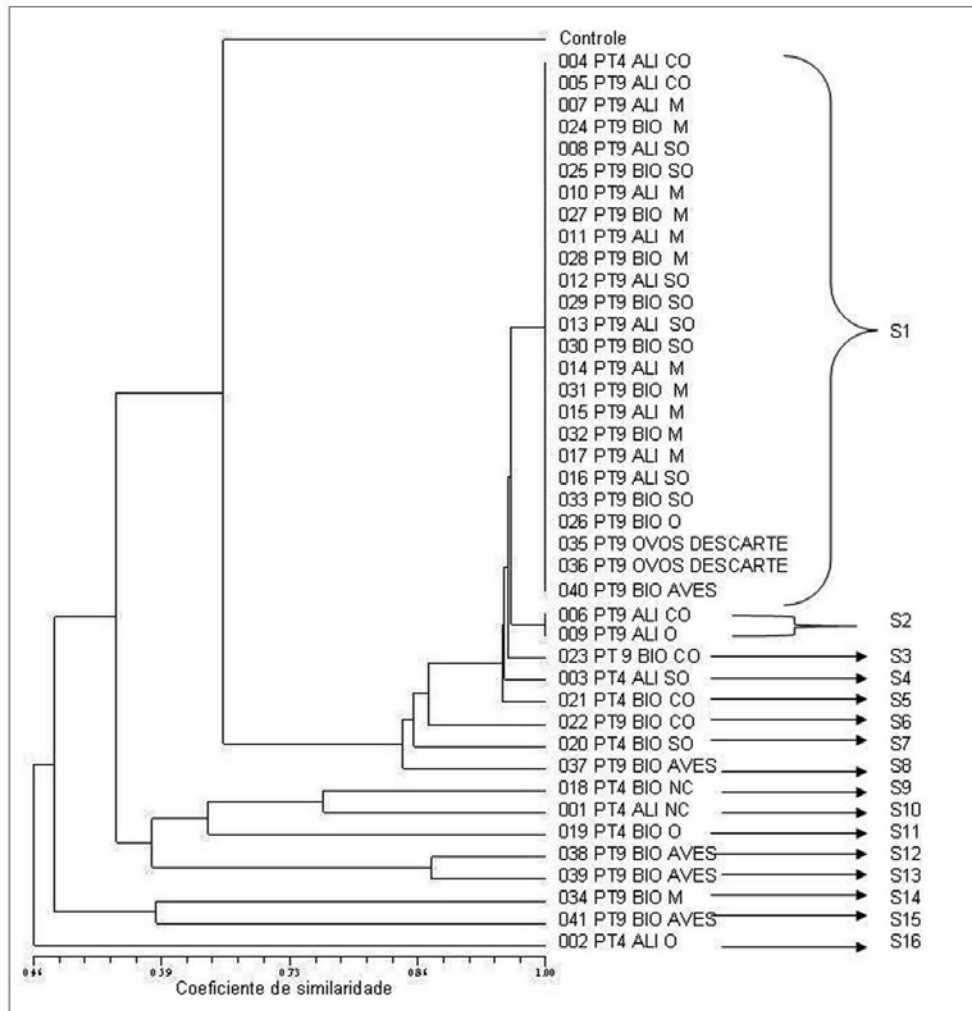


Figura 2 – Dendrograma de similaridade genética entre as cepas de *Salmonella* Enteritidis PT4 e PT9, isoladas de alimentos (ALI), material biológico humano (BIO), ovos de descarte e material avícola (BIO AVES) envolvidos ou não em surtos ocorridos no Estado do Paraná, no período de 2002 a 2006. S1 a S16: diferentes perfis genéticos observados para as cepas analisadas, após digestão com endonuclease *Spe I*. A matriz de similaridade genética após PFGE com as endonucleases *Xba I* e *Spe I*, foram calculadas pelo coeficiente de Dice e os isolados agrupados pelo método UPGMA. CO: Região Centro Ocidental; M: Metropolitana; SO: Sudoeste; O: Oeste; NC: Norte Central.

A bibliografia de estudos brasileiros que empregam PFGE para subtipar cepas de SE não é vasta. Matsuoka et al. (2004) avaliaram por PFGE, empregando *Xba I* e *Spe I*, cepas de SE isoladas de pacientes e da dieta enteral

associadas a um surto ocorrido em um Hospital Universitário de São Paulo, Brasil e observaram elevada similaridade entre as cepas.

Tabela 2 – Distribuição das cepas de *Salmonella* Enteritidis conforme fagotipos, ano de isolamento e perfis de PFGE.

Nº SURTO	PT	ANO	Cepa Alimento/ Perfil PFGE	Cepa Paciente/ Perfil PFGE	Cepa Material Avícola/ Perfil PFGE
			Cepa/ Perfil	Cepa/ Perfil	Cepa/ Perfil
Surto 1	4	2002	001 / X13S10		
Surto 2	4	2003	002 / X12S16		
Surto 3	4	2003	003 / X9S4		
Surto 4	4	2003	004 / X4S1	021 / X5S5	
Surto 5	9	2003	005 / X1S1	022 / X1S6	
Surto 6	9	2003	006 / X1S2	023 / X1S3	
Surto 7	9	2003	007 / X1S1	024 / X1S1	
Surto 8	9	2004	008 / X1S1	025 / X1S1	
Surto 9	9	2004	009 / X1S2	026 / X1S1	
Surto 10	9	2004	010 / X1S1	027 / X1S1	
Surto 11	9	2004	011 / X1S1	028 / X1S1	
Surto 12	9	2004	012 / X1S1	029 / X1S1	
Surto 13	9	2004	013 / X1S1	030 / X1S1	
Surto 14	9	2005	014 / X1S1	031 / X1S1	
Surto 15	9	2005	015 / X1S1	032 / X1S1	
Surto 16	9	2006	016 / X6S1	033 / X7S1	
Surto 17	9	2006	017 / X1S1		
Cepas isoladas de pacientes com salmonelose	4	2002		018 / X15S9	
	4	2003		019 / X14S11	
	4	2003		020 / X10S7	
	9	2006		034 / X2S14	
Cepas de SE isoladas de material avícola	9	2002			041 / X13S15
	9	2003			035 / X1S1
	9	2004			036 / X3S1
	9	2006			037 / X8S8
	9	2006			038 / X11S12
	9	2006			039 / X11S13
	9	2006			040 / X16S1

X: Perfil PFGE obtido com enzima *Xba I*; S: Perfil PFGE obtido com enzima *Spe I*.
PT: fagotipo

Duas cepas de SE PT9 (035 e 036) isoladas de ovos de descarte de incubação apresentaram elevada similaridade (≥ 0.90) com as cepas relacionadas aos surtos analisados (Figs. 1 e 2).

Ovos de descarte de incubação destinados à produção de pintinhos de 1 dia são produzidos por matrizes em ninhos com cama de maravalhas. Parte desses ovos, oriundos de reprodutoras, apresenta defeitos na casca que facilitam a passagem de *Salmonella* da superfície para as estruturas internas do ovo aumentando o risco de contaminação (OLIVEIRA; SILVA, 2000). Esses ovos são doados ou vendidos para estabelecimentos produtores de alimentos ou em feiras livres. Desta maneira, a utilização na alimentação humana de ovos de descarte de incubação, assim como, o consumo de carne de frango proveniente de aves contaminadas podem ser fonte importante da salmonelose humana.

Cardinale et al. (2005) correlacionaram cepas de SE isoladas de humanos com cepas isoladas de carne de aves no Senegal. No mesmo ano, Woo (2005) na Coréia, utilizando as endonucleases *Xba I* e *Bln I*, verificou grande similaridade entre cepas de SE PT4 isoladas de material biológico de aves e as obtidas de pacientes com salmonelose.

No período de 1999 a 2003, PT4 predominou como agente responsável pelos surtos de salmonelose ocorridos no Estado do Paraná (ALCOCER, 2004). Os dados apresentados na Tab. 1, mostram uma mudança no período de 2003 a 2006, com a prevalência do fagotipo PT9.

Informações sobre ocorrência, origem, fontes de contaminação e disseminação de SE PT9 são escassas na literatura. Estudos mostram que alguns fagotipos tendem a predominar em determinadas regiões geográficas por um período de tempo (KARIUKY et al., 1999). Neste sentido, a tipagem das cepas através de métodos moleculares é fundamental para detectar as mudanças epidemiológicas (GHILARDI et al., 2006).

Ridley et al. (1998) observaram, ao analisar 60 cepas de SE isoladas no Reino Unido, que algumas cepas pertencentes ao mesmo fagotipo eram distintas genotipicamente, assim como cepas de diferentes fagotipos mostraram elevada similaridade genotípica.

Os resultados apresentados na tab. 2 e figs. 1 e 2 mostram que a técnica de PFGE permitiu a discriminação de cepas pertencentes a um mesmo fagotipo. Oito perfis genéticos diferentes foram obtidos para as cepas de SE PT4. As cepas 018, 019 e 020 de SE PT4 exibiram perfil genético bem diferenciado, indicando que esses casos humanos não estavam associados a surtos.

Lukinmaa et al. (1999) avaliaram 43 cepas de SE PT4 isoladas na Finlândia e observaram que as enzimas *Xba I* e *Spe I* possibilitaram a diferenciação dessas cepas em 7 perfis de PFGE, sugerindo que as mesmas eram de origens diferentes não relacionadas entre si. Em contrapartida, Ahmed et al. (2000) não diferenciaram, através de PFGE com as mesmas enzimas, cepas de SE PT8 envolvidas e não envolvidas em surtos ocorridos no Canadá.

No presente estudo, a PFGE discriminou as cepas de SE PT4 e PT9 (Fig. 3). Somente uma cepa SE PT4 (004) apresentou perfil PFGE idêntico às cepas SE PT9, quando submetida à restrição com *Spe I*. No entanto, as outras cepas PT4 analisadas neste estudo apresentaram perfis PFGE diferentes das cepas PT9. Weide-Botjes et al. (1998) também verificaram correlação entre o fagotipo e os perfis de PFGE de 76 cepas de SE.

Porém, algumas cepas estudadas, de diferentes fagotipos apresentaram perfil PFGE muito similares. Cepas PT4 com perfis X9S4, X4S1 e X5S5 apresentaram, aproximadamente, 0.90 de similaridade com o perfil X1S1 característico de cepas da SE PT9 isoladas dos surtos. Achados semelhantes foram observados por Nauerby et al. (2000) que encontraram perfis PFGE idênticos entre os fagotipos PT11 e PT 9a isolados na Dinamarca. Lapuz et al. (2007) também observaram perfis PFGE com alta similaridade (≥ 0.80) entre PT 1b e PT6 isolados no Japão, sugerindo estreita relação epidemiológica.

Andrigheto (2006) ao avaliar 108 isolados de SE obtidos em várias etapas da cadeia de produção industrial de carne de frango no sudeste do Brasil não verificou correlação entre fagotipagem e PFGE, indicando utilidade limitada da fagotipagem para estudos epidemiológicos. Outro fator que precisa ser levado em consideração, quando não há correlação entre PFGE e fagotipagem, são os eventos genéticos ocorridos ao acaso, incluindo mutação de ponto, inserção e deleção do DNA, que freqüentemente alteram os padrões PFGE durante o curso de um surto. Assim, isolados coletados no decorrer de períodos superiores a 6 meses podem apresentar perfis genéticos distintos e ausência de correlação epidemiológica (TENOVER et al., 1995).

Conforme relatos anteriores, cepas de SE podem alterar seu fagotipo devido a introdução de plasmídeos de resistência. Desta maneira, a conversão de fagotipos pode ocorrer sem mudanças no genótipo (NAUERBY et al., 2000).

O perfil de resistência antimicrobiana das 41 cepas analisadas revelou sensibilidade aos agentes antimicrobianos testados, exceto ao ácido nalidíxico, para o qual 17 (41,5%) cepas foram resistentes. Todas as cepas de origem avícola apresentaram resistência a este antimicrobiano.

Entre as 20 cepas com o perfil genético predominante (X1S1), sete (35,0%) apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, embora não tenha sido evidenciado um perfil genético característico de cepas resistentes ou sensíveis ao ácido nalidíxico.

Em todas as regiões geográficas analisadas foram observadas cepas resistentes distribuídas ao longo do período analisado.

A análise de perfil de resistência antimicrobiana como método de tipagem das cepas analisadas apresentou baixo poder discriminatório ($D = 0,498$), no entanto em associação com a PFGE o índice observado foi $D = 0,880$, confirmando a importância da combinação de métodos fenotípicos e genotípicos na caracterização epidemiológica de SE.

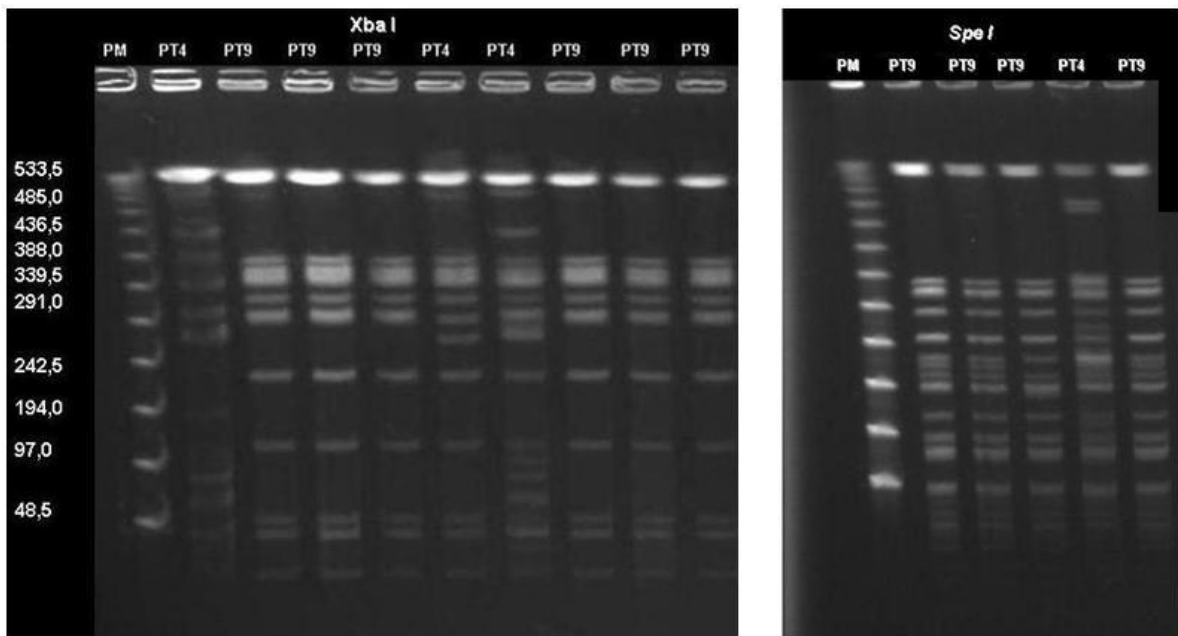


Figura 3 – Padrões obtidos com cepas de SE PT4 e PT9 isoladas de alimentos, material biológico humano, ovos de descarte e material avícola envolvidos ou não em surtos ocorridos no estado do Paraná, no período de 2002 a 2006 após PFGE com as endonucleases de restrição *Xba I* e *Spe I*.

No presente estudo, a fagotipagem foi utilizada por ser um método clássico de subtipagem de cepas do sorovar Enteritidis, e a técnica de PFGE com endonucleases *Xba I* e *Spe I* por ser considerada a técnica padrão ouro para tipificação molecular deste sorovar. As cepas de SE PT9 analisadas apresentaram elevada similaridade entre si, indicando alta correlação epidemiológica e possível clonalidade das mesmas. PFGE foi capaz de relacionar genótipos com a fagotipagem por diferenciar a maioria das cepas SE PT4 e SE PT9. Cepas isoladas de pacientes com salmonelose também puderam ser diferenciadas pela técnica de PFGE e ainda, foi possível observar que cepas provenientes da avicultura de corte podem ter sido fontes de salmonelose humana no período estudado.

Embora o perfil de resistência antimicrobiana associado à análise PFGE permitiu discriminar as cepas, não foi identificado um perfil genético característico de resistência ao ácido nalidíxico. Adicionalmente, o fato de todas as cepas de origem avícola apresentarem resistência a este agente reforça a necessidade da redução da pressão seletiva exercida pelo uso de quinolonas na produção animal.

REFERÊNCIAS

ALCOCER, I. R. **Sorotipagem, Fagotipagem, Caracterização Molecular de Cepas de *Salmonella* spp. e Avaliação Epidemiológica de Surtos Ocorridos no Paraná de 1999 a 2004.** 2004. 216 f. Tese [Doutorado em Ciência de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

AHMED, R. et al. Epidemiologic Typing of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in a Canada-Wide Outbreak of Gastroenteritis due Contaminated Cheese. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2403-2406, jun. 2000.

ANDRIGHETO, C. **Disseminação de Salmonella Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica.** 2006. 99 f. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v. 45, p. 493-496, 1966.

BESSA, M. C., **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul.** 2006. 145 p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BOXRUD, D. et al. Comparison of Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 536-543, 2007.

CARDINALE, E. et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *Enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from Humans and broiler chickens in Senegal using pulse-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, p. 968-977, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Salmonella* serotype Typhimurium by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In: _____. **PulseNet: the national molecular subtyping network for foodborne disease surveillance**. Atlanta: Centers for Disease Control, 1999. Section 5.2, p.1.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Sixteenth Informational Supplement**, M100-S16, v. 26, n. 3, 2006.

DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. **Ecology**, **Tempe**, v. 26, p. 297-302, 1945.

FERNANDES, S. A. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 45, p. 59-63, 2003.

GERMANO, P. M. L; GERMANO M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GHILARDI, A. C. R., TAVECHIO, A. T., FERNANDES, S.A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n.3, p. 281-286, maio 2006.

HUNTER, P. R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 9, p. 1903-1905, 1990.

KARIUKI, S. et al. Analysis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by phage typing, antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis. **J Med Microbiol** v. 48, p. 1037- 1042, 1999.

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. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 40, p. 27-34, 1998.

- LAPUZ, R. et al. An epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis contamination in a rat-infested chicken layer farm, an egg processing facility, and liquid egg samples by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 69, n. 6, p. 649-652, 2007.
- LIEBANA, E. et al. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 1, p. 154-161, 2001.
- LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v. 44, p. 52-59, 1996.
- LUKINMAA, S. et al. *Salmonella* Enteritidis phage types 1 and 4: pheno- and genotypic epidemiology of recent outbreaks in Finland. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 7, p. 2176-2182, 1999.
- MATSUOKA, D. M. et al. A nosocomial outbreak of *Salmonella Enteritidis* associated with lyophilized enteral nutrition. **J. Hosp. Infect.**, v. 58, p. 122-127, 2004.
- MURAKAMI, K. et al. Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. **Epidemiology and Infection**, v. 126, p. 159-171, 2001.
- NAUERBY, B. et al. Comparison of Danish Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT9a and PT11 from hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and humans by plasmid profiling and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 10, p. 3631-3635, 2000.
- OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.
- OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 6, dez. 2000.
- PETERS T. M. et al. The Salm-gene project: a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. **Eurosurveillance**, v. 8, p. 46- 50, 2003.
- RIBOT E. M., R. K. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. **Emerg. Infect. Dis.** v. 8, p. 387-391, 2002.
- RIDLEY, A. M.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsedfield gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 8, p. 2314-2321, 1998.
- SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella enteritidis* em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, London, v. 163, p. 688, 1949.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy**: the principles and practice of numerical classification. San Francisco: H. W. Freeman, 1973. 573 p. (A series of books in biology).

SWAMINATHAN, B. et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, n. 3, p. 382-389, 2001.

TAVECHIO, A. T. **Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo 1,4,[5],12:i:- e de *Salmonella* Typhimurium**. São Paulo. 2006. 147 p. Tese [Doutorado em Ciências]

TÉO, C. R. P. A., **Avaliação Epidemiológica dos Surtos de Salmonelose Ocorridos no Paraná Entre Janeiro de 1999 e Junho de 2001**. 2002. 101 p. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2002.

TENOVER, F. C. Et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.** v. 33, p. 2233-2239, 1995.

VAZ, C. S. L. **Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul**. 2007. 135 f. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

WEIDE-BOTJES, M.; KOBE, B.; SCHWARZ, S. Inter- and intra-phage type differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates using molecular typing methods. **Zentralbl. Bakteriol.**, Stuttgart, v. 288, p. 181- 193, 1998.

WOO, Y. K. Finding the Sources of Korean *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 Isolates by Pulsed-field Gel Eletrophoresis. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 424-429, 2005.

ZHENG, J. et al. Enhanced subtyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1932-1935, 2007.

4.3 ARTIGO C – OVOS DE POSTURA COMERCIAL *VERSUS* OVOS DE DESCARTE DE INCUBAÇÃO: IMPLICAÇÕES EM SAÚDE PÚBLICA

Resumo

Salmonella Enteritidis (SE) adaptou-se às linhagens de aves empregadas na avicultura comercial, devido à capacidade de transmissão tanto vertical quanto horizontal. A persistência na indústria avícola resultou na freqüente associação de carne de aves, ovos e derivados em surtos de salmonelose humana. Esta pesquisa verificou a ocorrência de *Salmonella* spp. em ovos destinados ao consumo humano, identificou os sorovares e fagotipos mais freqüentes e avaliou o padrão de resistência a antimicrobianos das cepas isoladas. Cinco mil ovos destinados ao consumo humano foram analisados. Quatro mil foram obtidos em granjas de postura comercial e mil ovos de descarte de incubação de matrizes de corte foram adquiridos em feiras livres e no comércio informal. O percentual de isolamento de *Salmonella* spp. nos ovos de descarte de incubação oriundos de matrizes de corte foi de 52,0% com predomínio do sorovar Enteritidis (84,6%). SE PT7 foi o fagotipo predominante (26,9%), no entanto outros dois fagotipos foram identificados, PT1 (15,4%) e PT9 (11,6%). Não houve isolamento de *Salmonella* nos ovos obtidos em granjas de postura comercial. Do total de cepas de SE analisadas, seis cepas (23,1%) foram resistentes ao ácido nalidíxico, o que pode resultar em falhas no tratamento de salmonelose humana com fluoroquinolonas. Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os ovos provenientes de granjas de postura comercial apresentam baixo risco de transmissão de *Salmonella* para o ser humano, ao contrário dos ovos de descarte de incubação que parecem representar uma importante fonte de infecção.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis. Ovos. Salmonelose. Resistência antimicrobiana.

TABLE EGGS *VERSUS* HATCHING EGGS OF INCUBATION: IMPLICATIONS IN PUBLIC HEALTH

Abstract

Salmonella Enteritidis (SE) adapted itself to the strains of birds used in the poultry business, due to the ability of transmission both vertically and horizontally. The persistence in the poultry industry resulted in the frequent association of poultry meat, eggs and by-products in outbreaks of human salmonellosis. This study checked the occurrence of *Salmonella* spp. in eggs for human consumption, identified the most frequent serovars and phage type and assessed the pattern of resistance to antibiotics of the strains. Five thousand eggs for human consumption were analyzed. Four thousand were obtained from commercial farms and a thousand eggs, hatching eggs of incubation of broiler breeders were purchased in free markets

and in the informal trade. The percentage of isolation of *Salmonella* spp. on the disposal of hatching eggs from broiler breeders was 52.0% with predominance of serovar Enteritidis (84.6%). No strain of *Salmonella* was isolate from eggs from commercial farms. From the total strains of SE tested, six strains (23.1%) were resistant to nalidixic acid, which can result in failures in the treatment of human salmonellosis with fluoroquinolones. The results obtained from this study suggest that eggs from poultry business present a low risk of transmitting *Salmonella* to humans, unlike the hatching eggs of incubation which cold represent an important source of infection.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis. Eggs. Salmonellosis. Antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

A salmonelose é considerada uma das mais importantes zoonoses e uma das principais enfermidades transmitidas por alimentos (TAVECHIO, 2006). No Brasil, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) é a causa mais freqüente de infecção de origem alimentar.

Salmonella apresenta vários reservatórios animais e tem habilidade de sobreviver e persistir no ambiente . Porém, surtos de salmonelose humana têm sido associados ao consumo de carne de aves, ovos e derivados.

De acordo com dados do Laboratório Central do Estado (LACEN), Curitiba, Paraná, alimentos a base de ovos foram associados a 45,0% dos últimos surtos de salmonelose ocorridos no Estado, no período de 1999 a 2008. SE predominou tanto nas amostras de pacientes (87,8%) quanto nas amostras de alimentos envolvidos nos surtos (80,6%).

SE adaptou-se às linhagens de aves empregadas na avicultura comercial, onde provavelmente ocupou o nicho deixado pelos sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, os quais eram de maior importância na avicultura, antes da adoção de medidas de controle e prevenção. Como a infecção das aves por SE muitas vezes ocorre sem a manifestação clínica, a dificuldade da detecção de aves infectadas facilitou a disseminação (VAZ, 2007).

SE persiste na indústria avícola devido à capacidade de transmissão tanto vertical quanto horizontal (OKAMURA et al., 2001). Pesquisas realizadas com ovos comerciais indicam que, geralmente, menos de 1% dos mesmos estão contaminados com SE (GAST; HOLT, 2000; KINDE et al., 2000). Porém, SE pode

multiplicar, especialmente na gema, se ovos contaminados forem expostos a temperaturas adequadas (GRIJSPEERDT; HERMAN, 2003).

O Brasil é o sétimo produtor mundial de ovos e o segundo de carne de frango. A produção em 2008 foi aproximadamente de 27,0 bilhões de ovos e 10,2 milhões de toneladas de carne de frango. O Paraná, maior produtor de frango do país, produziu 2,5 milhões de toneladas de carne e 2,5 bilhões de ovos (IBGE, 2009).

Esta pesquisa teve como objetivos verificar a ocorrência e identificar os sorovares e fagotipos mais freqüentes de *Salmonella* spp. em ovos destinados ao consumo humano. Os ovos foram provenientes de granjas de postura comercial e de descarte de incubação de aves reprodutoras de corte. O perfil de resistência a antimicrobianos das cepas isoladas também foi analisado.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de Amostras

Um total de 5.000 ovos foram analisados neste trabalho, no período de agosto de 2003 a dezembro de 2006. Três mil ovos foram obtidos de granjas de aves de postura comercial de uma integração avícola registrada junto ao Serviço de Inspeção Federal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Um mil ovos de granjas de postura comercial foram adquiridos de pequenos produtores rurais registrados junto ao Serviço de Inspeção Municipal e 1.000 ovos de descarte de incubação, provenientes de matrizes de corte, foram adquiridos em feiras livres e comércio informal.

Isolamento Bacteriológico

O isolamento bacteriológico foi realizado segundo o preconizado pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 1995). As amostras foram transportadas ao laboratório e divididas em 250 sub-amostras compostas por 20

ovos cada. Cada sub-amostra foi colocada em sacos plásticos esterilizados e adicionados 200 mL de água peptonada tamponada 1% (MERCK, Alemanha). Após a lavagem manual da superfície dos ovos, a água peptonada utilizada na lavagem foi colocada em saco plástico esterilizado e incubada a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas. Para o enriquecimento seletivo, 1 e 0,1 mL do pré-enriquecimento foram inoculados em 10 mL de caldo tetrionato (DIFCO, Estados Unidos) e em 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis (MERCK, Alemanha), respectivamente. Os caldos de enriquecimento seletivo foram incubados por 24 a 30 horas a $41 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Ágar Xilose Lisina Desoxicolato – XLD (MERCK, Alemanha) e Ágar Verde Brilhante com Novobiocina a 4% – VB (DIFCO, Estados Unidos) foram utilizados para plaqueamento diferencial e incubados a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Os mesmos 20 ovos de cada sub-amostra e que foram lavados com água peptonada tamponada 1% (MERCK, Alemanha), foram quebrados em um recipiente esterilizado para a separação asséptica da gema. As gemas foram misturadas e uma alíquota de 25g foi cultivada em 225 mL de água peptonada tamponada 1% (MERCK, Alemanha) a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas. O enriquecimento seletivo e o plaqueamento diferencial foram realizados como descrito acima.

As colônias características de *Salmonella* (lactose negativas e produtoras de H_2S) foram submetidas à triagem bioquímica com as seguintes provas: crescimento em Citrato de Simmons (BIOBRÁS, Brasil), motilidade e produção de indol em meio Sulfito Indol Motilidade (BIOBRÁS, Brasil), produção de H_2S e gás em ágar tríplice açúcar ferro (BIOBRÁS, Brasil), descarboxilação da lisina (DIFCO, Estados Unidos) e hidrólise da uréia (DIFCO, Estados Unidos).

A confirmação do sorovar e a fagotipagem foram realizadas no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas.

A tabela 1 apresenta a distribuição das amostras analisadas neste estudo de acordo com a origem das mesmas.

Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada através da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). Os seguintes agentes antimicrobianos foram testados (OXOID®): ampicilina (10µg); cloranfenicol (30µg); ácido nalidíxico (30µg); cefotaxima (30µg); ciprofloxacina (5µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (25µg). Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos em mm, com auxílio de paquímetro.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A prevalência de *Salmonella* spp. em ovos destinados ao consumo humano encontrada no presente trabalho, de acordo com a origem e método de isolamento, está apresentada na tabela 1. Não houve isolamento de *Salmonella* spp. em ovos provenientes de granjas de postura comercial. *Salmonella* spp. foi detectada em amostras de ovos de descarte de incubação e houve diferença significativa nos resultados obtidos com os dois métodos de isolamento utilizados. O patógeno foi isolado em 23 (46,0%) e 3 (6,0%) das 50 amostras analisadas através da análise da lavagem superficial dos ovos e da análise das gemas, respectivamente.

Tabela 1 – Distribuição e prevalência de *Salmonella* spp. em ovos destinados ao consumo humano, de acordo com a origem e método de isolamento.

Origem da amostra	Nº total de unidades	Lavagem	“pool” de gemas
		positivas/testadas*	positivas/testadas*
Granjas de Postura comercial registradas no SIF	3.000	0 / 150	0 / 150
Granjas de Postura comercial registradas no SIM	1.000	0 / 50	0 / 50
Ovos de descarte de incubação	1.000	23 / 50	3 / 50
Total	5.000	23 / 250	3 / 250

* número de amostras positivas / número de sub-amostras analisadas

Maior percentagem de isolamento de *Salmonella* na casca de ovos foi também observada por outros autores que analisaram ovos de postura comercial. Oliveira e Silva (2000) analisaram 124 amostras de ovos constituídas cada uma de 10 ovos e encontraram SE em 9,6% das cascas analisadas e 3,20% das gemas. Fehlhaber e Janetschke (1995) analisaram 5.339 ovos provenientes de aves comprovadamente infectadas e o isolamento de *Salmonella* spp. na casca e no interior dos ovos foi de 4,19% e 0,20%, respectivamente.

Baixas percentagens de isolamento de *Salmonella* spp. têm sido encontradas, principalmente na parte interna do ovo (FEHLHABER; JANETSCHKE, 1995; FLÔRES, 2001). A maioria dos trabalhos internacionais relata percentagens de isolamento em ovos comerciais variando de 0,2 a 2,0% (NAVARRO, 1995; SCHUTZE et al., 1996; GAMA, 2001).

No Brasil, os poucos levantamentos sobre a presença de *Salmonella* spp. em ovos comerciais (LANGONI et al., 1995) relatam a não presença desse patógeno ou contaminação variando de 0,2 a 9,6% (LANGONI et al., 1995; OLIVEIRA & SILVA, 2000; GAMA, 2001; FLÔRES, 2001; BAÚ et al., 2001).

A contaminação dos ovos pode ocorrer devido à infecção do ovário e oviduto (THIAGARAJAN et al., 1994; KELLER et al., 1995; MIYAMOTO et al., 1997), mas na maioria das vezes ocorre em razão da eliminação fecal da bactéria (GAST; BEARD, 1993) e posterior contato com o ovo.

A possibilidade do ovo oferecer risco de transmissão da salmonelose é maior quando a contaminação ocorre por deposição da bactéria na casca e a sua posterior penetração ou a permanência nesta estrutura proporcionando a contaminação cruzada. Neste sentido é fundamental considerar o tipo de ovo analisado, uma vez que ovos de postura comercial são provenientes de matrizes leves reprodutoras criadas em gaiolas, diferentes das matrizes de corte. Ovos de descarte de incubação destinados à produção de pintinhos de 1 dia são produzidos por matrizes em ninhos com cama de maravalhas. Parte desses ovos, oriundos de reprodutoras, apresenta defeitos na casca que facilitam a passagem de *Salmonella* da superfície para as estruturas internas do ovo aumentando o risco de contaminação (OLIVEIRA; SILVA, 2000). Esses ovos são doados ou vendidos para estabelecimentos produtores de alimentos ou em feiras livres. Desta maneira, a utilização na alimentação humana de ovos de descarte de incubação, assim como, o

consumo de carne de frango proveniente de aves contaminadas podem ser fonte importante da salmonelose humana.

Entretanto, ovos inspecionados e previamente higienizados oferecem menor risco à saúde pública. Jones et al. (1995) encontraram *Salmonella* spp. em 72% das amostras analisadas de ambiente de processamento de ovos. Porém, ao examinar os ovos, 7,78% das cascas foram positivas antes do processo de descontaminação, 1,10% após a desinfecção dos ovos e *Salmonella* não foi encontrada internamente em nenhum dos ovos analisados.

A sorotipagem e fagotipagem das 26 cepas de *Salmonella* spp. isoladas neste trabalho em ovos de descarte de incubação estão apresentadas na tabela 3. *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar predominante (84,60 %). Outros três sorovares foram identificados, S. Heidelberg, S. Anatum e S. Mbandaka.

Considerando a fagotipagem de linhagens de SE, foram detectados três fagotipos (PT), PT1, PT7 e PT9. Entre as 14 cepas tipáveis, sete (50,0%) eram do PT7 (Tabela 2).

SE emergiu como um grande problema avícola e de saúde pública no Brasil a partir de 1993. Os estudos epidemiológicos, sugerem a entrada de SE no Brasil via importação de material genético contaminado da avicultura de corte, provavelmente no final da década de 80. As taxas de crescimento da avicultura brasileira na década de 90 criaram condições favoráveis para a manutenção e proliferação da SE nos plantéis avícolas. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos em aves, particularmente de quinolonas, levou à manutenção de lotes positivos para SE (SILVA; DUARTE, 2002).

Embora em vários países a infecção por SE esteja relacionada com o consumo de produtos de origem avícola contaminados, os fagotipos (PT) prevalentes não são os mesmos nos diferentes países (COX, 1995).

Os fagotipos PT1 e PT7, caracterizados nesta pesquisa, podem ser derivados do fagotipo PT4 por conversão (LACONCHA et al., 1998; LING et al., 1998). O fagotipo PT9 identificado também neste trabalho, não apresenta referências na literatura quanto a sua ocorrência, origem, fontes de contaminação e disseminação.

No Paraná, no período de 1999 a 2003, o fagotipo PT4 predominou como responsável pelos surtos de salmonelose (ALCOCER, 2004). Entretanto, no período de 2003 a 2006, houve uma mudança com a prevalência do fagotipo PT9.

Assim, os resultados desta pesquisa possibilitam correlacionar os produtos de origem avícola, principalmente da avicultura de corte, como prováveis veículos de SE para a população.

Tabela 2 – Identificação dos sorovares e fagotipagem de SE de acordo com o método de isolamento e perfil de resistência antimicrobiana.

Sorovar / Fagotipo (PT)	Método Isolamento		Perfil de Resistência Antimicrobiana	
	Lavagem	“pool” gema	Resistente ao ácido nalidíxico	Sensíveis*
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
SE UT	7 (26,9)	1 (3,8)	2 (7,8)	6 (23,2)
SE PT7	7 (26,9)	-----	1 (3,8)	6 (23,2)
SE PT1	4 (15,4)	-----	1 (3,8)	3 (11,2)
SE PT9	1 (3,8)	2 (7,8)	2 (7,8)	1 (3,8)
S. Heidelberg	2 (7,8)	-----	-----	2 (7,8)
S. Mbandaka	1 (3,8)	-----	-----	1 (3,8)
S. Anatum	1 (3,8)	-----	-----	1 (3,8)
Total	23 (88,4)	3 (11,6)	6 (23,2)	20 (76,8)

* UT: Não tipável; ** Sensíveis a todos os antimicrobianos testados: ampicilina (10µg); cloranfenicol (30µg); ácido nalidíxico (30µg); cefotaxima (30µg); ciprofloxacina (5µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (25µg).

Avaliando o perfil de resistência antimicrobiana das 26 cepas, todas apresentaram sensibilidade a maioria dos agentes antimicrobianos testados, exceto seis (23,10%) cepas de SE que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico (Tabela 2). As cepas de outros sorovares identificados nesta pesquisa foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados.

Ao contrário de outros sorovares de *Salmonella enterica*, até recentemente SE permaneceu sensível a maioria dos antimicrobianos (MOLBAK et al., 2002). No entanto, com a disseminação de SE na avicultura, os antimicrobianos passaram a ser utilizados de forma mais intensiva, visto que mascaram a infecção por este patógeno (SILVA; DUARTE, 2002). Com isto, recentemente vem sendo

observado o aumento das cepas resistentes, principalmente em relação às quinolonas (VAZ, 2007).

Os resultados desta pesquisa confirmam que o ovo constitui um risco à saúde pública, como veículo importante de salmonelose humana. Entretanto, é fundamental considerar o tipo de ovo a ser exposto ao consumo.

Pela frequência de contaminação descrita na literatura e observada nesta pesquisa, ovos provenientes de aves de postura comercial inspecionados oferecem baixo risco à saúde pública, possivelmente porque a disseminação de *Salmonella* é dificultada pelas condições de criação. Por outro lado, o isolamento de *Salmonella* em 52% dos ovos de descarte de incubação, o predomínio do sorovar Enteritidis e a identificação de PT9, recentemente implicado em surtos humanos, sugerem que ovos de descarte de incubação oriundos de matrizes de corte podem representar importante veículo de transmissão deste patógeno. A observação de que 23,2% das cepas de SE apresentaram resistência ao ácido nalidíxico também é um fato relevante, uma vez que pode resultar em falhas no tratamento clínico humano.

Referências

ALCOCER, I. R. **Serotipagem, Fagotipagem, Caracterização Molecular de Cepas de *Salmonella* spp. e Avaliação Epidemiológica de Surtos Ocorridos no Paraná de 1999 a 2004.** 2004. 216 p. Tese [Doutorado em Ciência de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina , Londrina, 2004.

AOAC – Official Methods of Analysis. **Microbiological Methods.** 1995. Chapter 17.

BAÚ, A. J.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v. 45, p. 493-496, 1966.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **Sixteenth Informational Supplement**, M100-S16, v. 26, n. 3, 2006.

COX, J. M. *Salmonella* enteritidis: virulence factors and invasive infection in poultry. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 407-410, 1995.

FEHLHABER, K.; JANETSCHKE, P. **Higiene Veterinária de los Alimentos**. Acribia, Zaragoza, 1995. 669 p.

FLÔRES, M. L. **Avaliação da técnica da reação em cadeia pela polimerase na detecção de *Salmonella* sp em ovos de galinhas artificialmente contaminados, em ovos comerciais do tipo colonial e em alimentos a base de ovos, envolvidos em surtos de infecções alimentares**. 2001. 121p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GAMA, N. M. S. Q. ***Salmonella* sp em aves de postura comercial**. 2001. 59 p. Dissertação [Mestrado em Medicina Veterinária] – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2001.

GAST, R. K.; BEARD, C. W. Research to Understand and Control *Salmonella enteritidis* in Chickens and Eggs. **Poultry Science**, v. 72, p. 1157-1163, 1993.

GAST, R. K.; HOLT, P. S. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. **Poultry Science**, v. 79, p. 559-563, 2000.

GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. Inactivation of *Salmonella* enteritidis during boiling of eggs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 13-24, 2003.

HUMPHREY, T. J. et al. The influence of age on the response of SPF hens to infection with *Salmonella* enteritidis PT4. **Epidemiology Infection**, v. 106, p. 33-43, 1991.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística da Produção Pecuária – Março de 2009. **Indicadores IBGE**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 abr. 2009.

JONES, F. T.; RIVES, D. V.; CAREY, J. B. *Salmonella* contamination in commercial eggs and eggs production facility. **Poultry Science**, Kennett Square, v. 74, p. 753-757, 1995.

KELLER, L. H.; BENSON, C. E.; ECKROADE, R. J. *Salmonella* Enteritidis colonization of the productive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 2443-2449, 1995.

KINDE, H. et al. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. **Avian Diseases**, v. 44, p. 239-248, 2000.

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. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 40, p. 27-34, 1998.

LANGONI, H. et al. Isolamento de salmonelas em ovos de galinha oferecidos no comércio de Botucatu – SP. **Revista Higiene Alimentar**, v. 9, p. 45-47, 1995.

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. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1693-1699, 1998.

MIYAMOTO, T. et al. *Salmonella* enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal, and intravenous routes. **Avian Diseases**, v. 41, p. 296-303, 1997.

MOLBAK, K.; GERNER-SMIDT, P. WEGENER, H. C. Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, 2002.

NAVARRO, M. P. Infecção por *Salmonella* Enteritidis em reprodutoras pesadas na América Latina. In: CONFERÊNCIA APINCO 95 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. 1995. Curitiba. **Anais**. Curitiba: FACTA, 1995. p. 7-16.

OKAMURA, M. et al. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v. 45, p. 61-69, 2001.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, 2000.

REZENDE, C. S. M. et al. Sorovares de *Salmonella* isolados de carcaças de frangos de corte abatidos no estado de Goiás, e perfil de resistência a antimicrobianos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, n. 555-556, p. 199-203, 2005.

SCHUTZE, G. E. et al. Prevalence of *Salmonella* Enteritidis in poultry shell eggs in Arkansas. **Society Microbiology Journal**, p. 1-4, 1996.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

TAVECHIO, A. T. **Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo 1,4,[5],12:i:- e de *Salmonella* Typhimurium.** São Paulo. 2006. 147 p. Tese [Doutorado em Ciências]

THIAGARAJAN, D.; SAEED, A. M.; ASEM, E. K. Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens. **Poultry Science**, v. 73, p. 119-127, 1994.

VAZ, C. S. L. **Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul.** 135 f. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

4.4 ARTIGO D – ESTUDO DA DIVERSIDADE CLONAL DAS LINHAGENS DE *Salmonella* Enteritidis ATRAVÉS DA TÉCNICA DE PFGE, ASSOCIADA AO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E FAGOTIPAGEM.

Resumo

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) é, atualmente, responsável por significativos prejuízos à avicultura, com conseqüências importantes para saúde pública. A vigilância epidemiológica de SE exige métodos eficazes para tipagem e investigação da diversidade e origem genética dos isolados, considerando o elevado grau de homogeneidade genética deste sorovar. Neste estudo foi realizada a tipagem de 38 isolados de SE, provenientes de material biológico de reprodutoras destinadas a produção de frangos de corte, utilizando três métodos para identificar diferentes graus de polimorfismo destas linhagens. Primeiramente foi realizada a fagotipagem, que é o método clássico utilizado como primeira etapa de diferenciação deste sorovar e a análise do perfil de resistência antimicrobiana, que juntos resultaram em alto poder discriminatório para os isolados estudados neste trabalho. Dentre as cepas possíveis de fagotipar, houve predomínio dos fagotipos PT7 e PT9. Das 38 cepas analisadas, 10 (26,3%) apresentaram resistência ao ácido nalidíxico. Ainda, realizou-se a caracterização molecular de treze cepas de SE, através da técnica PFGE com endonucleases de restrição *Xba I* e *Spe I*. Os resultados obtidos com este estudo permitem associar os produtos avícolas, oriundos da avicultura de corte, como fonte de salmonelose humana e destacam sua importância em veicular cepas de SE resistentes ao ácido nalidíxico, o que pode resultar em falhas no tratamento clínico. Ainda, esta pesquisa confirma a necessidade de associação de métodos de caracterização para uma investigação mais efetiva da diversidade de cepas de SE e a capacidade discriminatória de PFGE, inter e intra-fagotipo, essencial para investigações epidemiológicas deste sorovar que apresenta pequena diversidade genética.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis. Fagotipagem. Resistência antimicrobiana. Eletroforese em campo pulsado (PFGE).

STUDY OF CLONAL DIVERSITY OF THE *Salmonella* Enteritidis STRAINS THROUGH PFGE TECHNIQUE ASSOCIATED WITH THE PROFILE OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND PHAGE TYPIIFICATION.

Abstract

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) is currently responsible for significant losses to poultry with important consequences on public health.

Epidemiological surveillance of SE requires effective methods for typing as well as the investigation of the genetic diversity and origin among the isolates, considering the high degree of genetic homogeneity of this serovar. This study describes the typing of 38 isolated SE, from breeders' biological material intended for the production of broilers, using three methods to identify different degrees of polymorphism of these strains. Initially, was performed the phage typing, which is the classic method used as the first stage of this serovar differentiation and the analysis of the profile of antimicrobial resistance, which together resulted in high discriminatory power for the isolates studied in this work. Among the possible strains of phage typing, there was a predominance of phage type PT7 and PT9. From 38 strains analyzed, 10 (26.3%) presented resistance to nalidixic acid. Secondly, there was the molecular characterization of thirteen strains of SE, by the technique of PFGE with restriction endonucleases *Xba I* and *Spe I*. The results obtained with this study allow us to link the poultry products, originated from the broiled chicken as a source of human salmonellosis and highlight its importance in transmitting SE strains resistant to nalidixic acid, which can result in failures in clinical treatment. Moreover, this study confirms the need of combination of methods of characterization for a more effective investigation of the diversity of SE strains and PFGE discriminatory capacity, inter and intra-phage type, which are essential for epidemiological investigations of serovar that shows little genetic diversity.

Keywords: *Salmonella enteritidis*. Phage typing. Antimicrobial resistance. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

INTRODUÇÃO

A indústria avícola brasileira está entre as mais produtivas. O Brasil é o sétimo produtor mundial de ovos e o segundo de carne de frango. O Paraná, maior produtor de frango do país, produziu 2,5 milhões de toneladas de carne e 2,5 bilhões de ovos (IBGE, 2009). O Brasil é também o maior exportador mundial de carne de frango tanto em divisas quanto em volume (ANDRIGHETO, 2006).

Além do grande volume de exportações, é importante considerar o mercado interno, pois o consumidor brasileiro tem demonstrado preocupação com a inocuidade dos produtos, exigindo alimentos de origem animal com qualidade sanitária comprovada (BLAHA, 2001).

Portanto faz-se necessário o controle eficiente da ocorrência de patógenos na cadeia de produção, com a finalidade de oferecer produtos inócuos ao consumidor, bem como para vencer as barreiras comerciais à exportação de seus produtos (VAZ, 2007).

Produtos avícolas são os principais veículos de transmissão de *Salmonella* spp. (RIBEIRO et al., 2007) e esse fato se deve, em grande parte, ao crescimento da indústria avícola que ocorreu na maioria dos países dentro de uma visão econômica tipicamente de produção (HOFER et al., 1997).

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) é, atualmente, responsável por significativos prejuízos à avicultura, tendo um caráter de zoonose com conseqüências importantes para a saúde pública. Diversos autores têm relatado que em aves este sorovar pode ser transmitido verticalmente (transmissão transovariana), sugerindo uma adaptação da bactéria a estes hospedeiros (KINDE et al., 2000; OKAMURA et al., 2001).

A prevenção e o controle de SE depende de um efetivo instrumento de detecção e caracterização (LUNGE et al., 1996). A vigilância epidemiológica de SE exige métodos eficazes para subtipagem e investigação da diversidade e origem genética dos isolados (LIEBANA et al., 2001), pois este sorovar apresenta elevado grau de homogeneidade genética (WEIDE-BOTJES et al., 1998; MURAKAMI et al., 2001; BOXRUD et al., 2007; ZHENG et al., 2007).

Diferentes métodos são utilizados para a caracterização das cepas de SE. Métodos fenotípicos clássicos utilizados como primeira diferenciação entre cepas deste sorovar compreendem a fagotipagem e a análise do perfil de resistência a antimicrobianos (WOO, 2005; ANDRIGHETO, 2006; BESSA, 2006; VAZ, 2007). Métodos moleculares de análise do DNA frequentemente complementam as técnicas fenotípicas em estudos epidemiológicos. Métodos genotípicos incluem o perfil plasmidial, o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Random amplified polymorphic DNA – RAPD), a ribotipagem e a eletroforese de campo pulsado (Pulsed field gel electrophoresis – PFGE) (LACONCHA et al., 1998; AHMED et al., 2000; WOO, 2005).

Os principais critérios na escolha de métodos para tipificação de SE incluem a capacidade do método em tipificar todas as linhagens analisadas, a reprodutibilidade do ensaio e o poder de discriminação (OLIVE & BEAN, 1999). Neste sentido, PFGE tem sido utilizada eficientemente na subtipagem de cepas de SE (LIEBISCH; SCHWARZ, 1996; WIEDE-BOTJES et al., 1998; LACONCHA et al., 1998).

Baseado nestas colocações, o presente estudo investigou a diversidade clonal de linhagens de SE isoladas de material de origem avícola. A

técnica de PFGE, associada ao perfil de resistência a antimicrobianos e à fagotipagem, foi utilizada com a finalidade de verificar a correlação epidemiológica entre os isolados de SE e surtos de salmonelose humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de *Salmonella* Enteritidis

Trinta e oito cepas de SE, isoladas de suabes de cloaca, órgãos e fezes de reprodutoras destinadas a produção de frangos de corte, foram obtidas em um laboratório de sanidade avícola credenciado junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no período de 2002 a 2006.

A confirmação do sorovar e a fagotipagem foram realizadas no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Bacteriologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas.

Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada através da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966), seguindo as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006). Os seguintes agentes antimicrobianos foram testados (OXOID[®]): ampicilina (10µg); cloranfenicol (30µg); ácido nalidíxico (30µg); cefotaxima (30µg); ciprofloxacina (5µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (25µg). Os diâmetros dos halos de inibição foram medidos, em mm, com auxílio de paquímetro.

Análise do perfil de macrorestrição do DNA cromossômico através de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A obtenção do DNA total para análise PFGE, foi realizada conforme o protocolo proposto pelo "The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance" (PulseNet) (CDC, 1999).

Treze cepas de SE foram caracterizadas, SE UT (n=3), SE PT1 (n=2), SE PT7 (n=2), SE PT9 (n=6). Dois blocos de agarose contendo o DNA de cada cepa foram submetidos, separadamente, à restrição com 30 U das enzimas *Xba I* e *Spe I* (1 µg/mL, Invitrogen, Brasil). O marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG marker (New England Biolabs, USA) foi utilizado como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos. O gel foi, então, submetido à eletroforese de campo pulsado no equipamento CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), nas seguintes condições: tempo inicial de pulso 5s; tempo final de pulso 45s; voltagem 200V (6V/seg); tempo de corrida 24h, ângulo 120°C e temperatura de 14°C. Após o final da eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio 1µg/mL (Pharmacia Biotech). Os fragmentos gerados pela restrição enzimática foram visualizados em luz UV em equipamento gel documentador contendo programa adequado para a foto-documentação. Os padrões de macrorestrição foram comparados pelo programa NTSYSpc versão 2.0 (Exeter Software), usando-se coeficiente de similaridade de Dice (Dice, 1945) e análise de "clusters" (dendrograma) UPGMA ("Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average") (Sneath e Sokal, 1973).

O poder discriminatório (D) de cada enzima foi calculado com base no índice de diversidade de Simpson (SIMPSON, 1949), conforme apresentado por Hunter (1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As trinta e oito cepas de SE analisadas foram caracterizadas em três fagotipos (PT) diferentes ou não foram tipadas através dos fagos conhecidos (UT) (Tab. 1). O poder discriminatório (D) da fagotipagem foi de 0,719.

Dentre as cepas possíveis de fagotipar, houve predomínio dos fagotipos PT7 e PT9 (Tab. 1). O fagotipo PT1 também foi identificado neste trabalho em menores percentuais (10,5%). O fagotipo PT 4, associado durante muitos anos a surtos de salmonelose, causados por alimentos de origem avícola (ALCOCER, 2004), não foi caracterizado nas cepas de SE analisadas.

Tabela 1 – Distribuição das cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de material de origem avícola no Estado do Paraná, no período de 2002 a 2006, de acordo com os fagotipos identificados e o perfil de resistência antimicrobiana.

Fagotipo	Perfil de Resistência Antimicrobiana			
	Nº de cepas	Resistentes ao Ácido Nalidíxico	Resistentes ao Cloranfenicol	Sensíveis**
	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)	Nº (%)
UT*	16 (42,1)	5 (13,2)	1 (2,6)	10 (26,3)
PT 9	9 (23,7)	4 (10,5)	----	5 (13,2)
PT 7	9 (23,7)	1 (2,6)	---	8 (21,0)
PT 1	4 (10,5)	----	---	4 (10,5)
Total	38 (100)	10 (26,3)	1 (2,6)	27 (71,0)

* UT: Não tipável; ** Sensíveis a todos os antimicrobianos testados: ampicilina (10µg); cloranfenicol (30µg); ácido nalidíxico (30µg); cefotaxima (30µg); ciprofloxacina (5µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (25µg).

A prevalência dos fagotipos (PT) de SE varia entre diferentes países, entre regiões de um mesmo país e com o passar do tempo (ALCOCER, 2004). Acredita-se que SE, pelo seu caráter epidêmico, surgiu da expansão clonal de um isolado único e mais virulento, embora, diferentes linhagens tenham sido associadas a surtos na Europa e EUA (HELMUTH; SCHROETER, 1994; VAZ, 2007).

SE PT4 vem sendo mais prevalente na Europa, enquanto SE PT 8 e 13a os mais relatados nos Estados Unidos (GUARD-PETTER, 2001; GILLESPIE et al., 2005). Na região Sul do Brasil, PT4 tem sido o fagotipo de SE predominante (dos SANTOS et al., 2003). A sua disseminação em todo o país foi registrada a partir de 1993, após a importação de matrizes de países europeus (TAVECHIO et al., 1996).

Recentemente vem sendo registrado o declínio de surtos causados por SE PT4, o que pode ser atribuído às medidas de controle adotadas na cadeia produtiva (GILLESPIE et al., 2005). O que pode ter favorecido a introdução de outros fagotipos (FISHER, 2004; VAZ, 2007).

A identificação de PT1 e PT7, observada nesta pesquisa, foi relatada por outros autores em diversos países (NASTASI; MAMMINA, 1997; USERA et al., 2001; PRAT et al., 2001; FISHER, 2004) e também no Brasil (NUNES et al., 2003; ALCOCER, 2004, ANDRIGHETO, 2006). Estas cepas podem ser derivadas do fagotipo PT4 por conversão (LACONCHA et al., 1998; LING et al., 1998).

Informações sobre ocorrência, origem, fontes de contaminação e disseminação de SE PT9 são escassas. Estudos mostram que alguns fagotipos tendem a predominar em determinadas regiões geográficas por um período de tempo (KARIUKY et al., 1999) e que a tipagem destas cepas através de métodos moleculares é fundamental para detectar as mudanças epidemiológicas (GHILARDI et al., 2006).

PT4 predominou como responsável pelos surtos de salmonelose ocorridos no Paraná, no período de 1999 a 2003 (ALCOCER, 2004). Entretanto, no período de 2003 a 2006, ocorreu a prevalência de PT9 (KOTTWITZ, 2009).

A identificação de PT9 como um dos fagotipos predominantes em isolados de SE analisados nesta pesquisa sugere a correlação epidemiológica de produtos avícolas como fonte de salmonelose humana. Ainda, os fagotipos PT1 e PT7 e os outros sorovares detectados nesta pesquisa, já estiveram implicados em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Estado do Paraná, no período deste estudo (KOTTWITZ, 2009).

Considerado um dos melhores métodos moleculares para diferenciação de cepas bacterianas (OLIVE; BEAN, 1999), a eletroforese em campo pulsado tem sido extensamente utilizada para caracterizar diferentes sorovares de *Salmonella*. A diferenciação intersorovares é evidenciada por padrões de restrições próprios e relativamente uniformes (AHMED et al., 2000; LIEBANA et al., 2001; RIBOT et al., 2002; PETERS et al., 2003; FERNANDES et al., 2003).

As endonucleases *Xba I* e *Spe I* foram selecionadas para este estudo por apresentarem ótimo poder discriminatório para cepas de SE por PFGE, baseado em várias pesquisas (LIEBISCH; SCHWARZ, 1996; RIDLEY et al., 1998; WEIDE-BOTJES et al., 1998; NAUERBY et al., 2000; MATSUOKA et al., 2004).

Dez perfis genéticos designados de X1 a X10 foram obtidos para as 13 cepas de SE analisadas neste trabalho por PFGE utilizando *Xba I* como enzima de restrição. Com a enzima *Spe I* foram obtidos 5 perfis, designados de S1 a S5.

O poder discriminatório (D) obtido com as enzimas *Xba I* e *Spe I* foi, respectivamente, 0,962 e 0,539.

A análise do coeficiente de similaridade entre as cepas de SE permite verificar que PFGE, através da endonuclease *Xba I*, foi capaz de diferenciar os fagotipos estudados nesta pesquisa, possibilitando uma diferenciação entre os mesmos. A alta discriminação obtida com esta enzima permitiu uma diferenciação intra-fagotipos (Figs. 1a e 2).

A restrição com endonuclease *Spe I* resultou em um perfil predominante (S4) (Fig. 1b). Com a combinação das duas enzimas, foram obtidos 11 perfis genéticos. Não foi possível caracterizar um perfil genético predominante devido ao elevado poder discriminatório de *Xba I*.

A observação de que isolados do mesmo grupo genético possam estar ordenados em diferentes fagotipos e de que, isolados do mesmo fagotipo possam estar agrupados em diferentes grupos genéticos confirma que a fagotipagem pode ser um excelente complemento para a tipagem molecular de SE (WEIDE-BOTJES et al., 1998).

Protocolos que consistem na combinação de endonucleases com maior poder discriminatório para este sorovar, podem evitar dificuldades que decorrem da presença de sistemas de proteção do DNA de SE contra a clivagem por alguma enzima de restrição específica (LIEBISCH; SCHWARZ, 1996).

Avaliando o perfil de resistência antimicrobiana das 38 cepas analisadas, todas apresentaram sensibilidade a maioria dos agentes antimicrobianos testados, exceto 10 (26,3%) cepas apresentaram que resistência ao ácido nalidíxico. Uma cepa de SE UT (2,6%) foi resistente ao cloranfenicol (Tab. 1).

Considerando os fagotipos identificados, somente cepas SE PT1 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Linhagens dos fagotipos PT7, PT9 e UT apresentaram resistência ao ácido nalidíxico (Tab. 1).

O ácido nalidíxico é um agente antimicrobiano amplamente utilizado na produção avícola brasileira com finalidade terapêutica (VAZ, 2007). Entretanto, a utilização não-terapêutica também pode favorecer a seleção de cepas resistentes que poderão ser transmitidas via cadeia alimentar (THRELFALL, 2002). Aves poedeiras e de corte representam o principal reservatório de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos (SILVA; DUARTE, 2002).

A ocorrência de cepas resistentes pode causar falhas no tratamento clínico, limitando as opções terapêuticas tanto na medicina veterinária como humana, quando há necessidade de tratamento (ÂNGULO et al., 2004; SOUZA, 2008).

Resistência ao ácido nalidíxico tem sido observada por outros autores (CALIXTO et al., 2002; ANTUNES et al., 2003; CONCEIÇÃO et al., 2007). No entanto, Fernandes et al. (2003) e Oliveira et al. (2005) verificaram mais de 90,0% de sensibilidade de cepas de SE a esse antimicrobiano.

O poder discriminatório do perfil de resistência antimicrobiana demonstrou ser baixo ($D = 0,437$), no entanto, ao combinar a fagotipagem, este índice foi sensivelmente melhorado ($D = 0,851$), confirmando a importância da combinação de métodos na caracterização epidemiológica de SE.

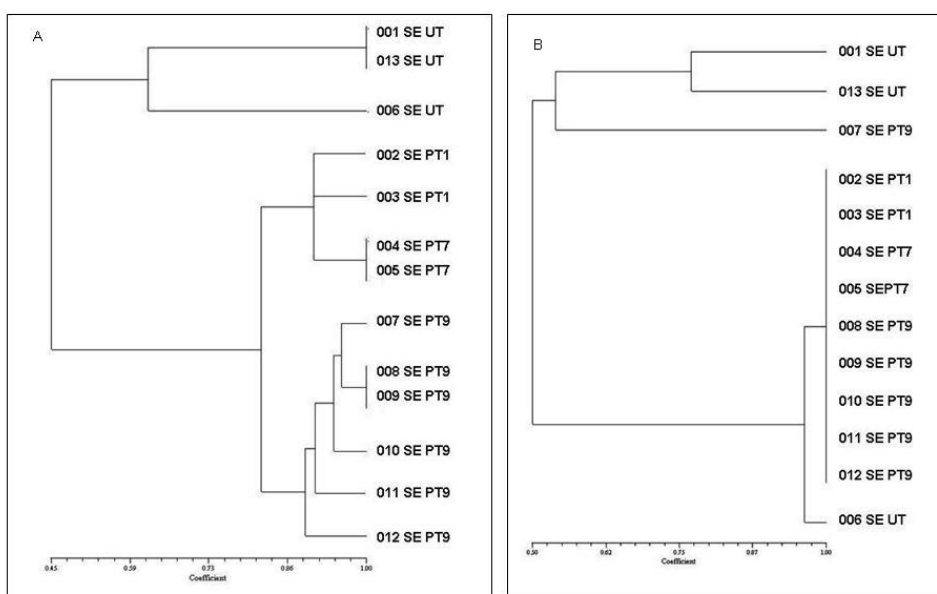


Figura 1 – representação do coeficiente de similaridade obtido pela análise de amostras de SE através de PFGE.

Fig 1a. Dendrograma obtido após análise com endonuclease *Xba I*.

Fig 1b. Dendrograma obtido após análise com endonuclease *Spe I*.

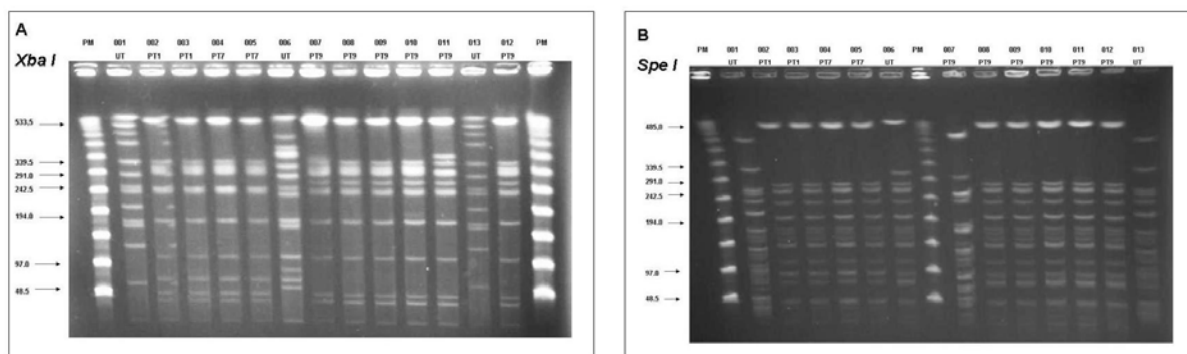


Figura 2a – Perfis genéticos obtidos para cepas de SE isoladas de material biológico de aves de corte, após PFGE com endonuclease de restrição *Xba I*.

Figura 2b – Perfis genéticos obtidos para cepas de SE isoladas de material biológico de aves de corte, após PFGE com endonuclease de restrição *Spe I*.

Nesta pesquisa não foi possível correlacionar os perfis genéticos obtidos através de PFGE com endonucleases *Xba I* e *Spe I*, com o padrão de resistência antimicrobiana. Diferenças na sensibilidade a antimicrobianos podem ser causadas por eventos como a aquisição de plasmídeos, os quais não necessariamente irão alterar o genótipo (CARDINALE, et al., 2005). Do mesmo modo, diferenças na pressão seletiva entre granjas podem estimular a emergência de linhagens resistentes, as quais podem ser utilizadas para a caracterização das amostras (ARBEIT, 2001 apud VAZ, 2007).

Concluindo, os resultados obtidos com este estudo permitem associar os produtos avícolas, oriundos da avicultura de corte, como possível fonte de salmonelose humana devido ao isolamento de SE PT 1, PT7 e PT9 e outros sorovares já implicados em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Estado do Paraná, no período deste estudo. E destacam sua importância em veicular cepas de SE resistentes ao ácido nalidíxico.

Esta pesquisa confirma a necessidade da associação de métodos fenotípicos e genotípicos de caracterização para uma investigação mais efetiva da diversidade de cepas de SE. A capacidade discriminatória de PFGE, inter e intra-fagotipo de SE é essencial nas investigações epidemiológicas envolvendo este sorovar devido a sua pequena diversidade genética.

REFERÊNCIAS

AHMED, R.; SOULE, G. et al. Epidemiologic Typing of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in a Canadá-Wide Outbreak of Gastroenteritis due Contaminated Cheese. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2403-2406, jun. 2000.

ALCOCER, I. R. **Sorotipagem, Fagotipagem, Caracterização Molecular de Cepas de Salmonella spp. e Avaliação Epidemiológica de Surtos Ocorridos no Paraná de 1999 a 2004**. 2004. 216 p. Tese [Doutorado em Ciência de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

ANDRIGHETO, C. **Disseminação de Salmonella Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica**. 2006. 99 f. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ÂNGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of na association between use of antimicrobial agents in foods animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and human consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 51, p. 374-379, 2004.

ANTUNES, P. et al. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. **Int. J. Food Microbiol.** v. 82, p. 97-103, 2003.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v. 45, p. 493-496, 1966.

BESSA, M. C., **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de Salmonella enterica sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul**. 2006. 145 p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BLAHA, T. E. Pré-harvest food safety and *Salmonella* reduction in pork chain. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS. **Resumos**. Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p. 39-47.

BOXRUD, D. et al. Comparison of Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 536-543, 2007.

CALIXTO, A. E. R. et al. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos, em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Higiene Alimentar**, v. 16, n. 101, p. 56-62, 2002.

CARDINALE, E. et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *Enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from Humans and broiler chickens in Senegal using pulse-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 968-977, 2005

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Salmonella* serotype Typhimurium by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In: _____. **PulseNet: The national molecular subtyping network for foodborne disease surveillance**. Atlanta: Centers for Disease Control, 1999. Section 5.2, p.1.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **Sixteenth Informational Supplement**, M100-S16, v. 26, n. 3, 2006.

CONCEIÇÃO, E. C. S. et al. Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 31-34, 2007.

DICE, L.R. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, *Tempe*, v.26, p.297-302, 1945.

FERNANDES, S. A. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 45, p. 59-63, 2003.

FISHER IST on behalf of the Enter-net participants. International trends in *Salmonella* serotypes 1998-2003 – A surveillance report from the Enter-Net International Surveillance Network. (www.hpa.org.uk/enter-net) **Eurosurveill** v. 9, n. 4, p. 45-7, 2004.

GHILARDI, A. C. R., TAVECHIO, A. T., FERNANDES, S. A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 281-286, maio 2006.

GILLESPIE, I. A. et al. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks? **Epidemiology and Infection**, v. 133, n. 5, p. 795-801, 2005.

GUARD-PETTER, J. The Chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 3, p. 421-430, 2001.

HELMUTH, R.; SCHROETER, A. Molecular typing for *S. Enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, p. 69-77, 1994.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, abr./jun, p. 55-62, 1997.

HUNTER, P. R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 28, n. 9, p. 1903-1905, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística da Produção Pecuária – Março de 2009. **Indicadores IBGE**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 12 abr. 2009.

KARIUKY, S. et al. Analysis of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium by phage typing, antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis. **J Med Microbiol**, v. 48, p. 1037-1042, 1999.

KINDE, H. et al. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. **Avian Diseases**, v. 44, p. 239-248, 2000.

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. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 40, p. 27-34, 1998.

LIEBANA, E. et al. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 39, n. 1, p. 154-161, 2001.

LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. enterica serovar Enteritidis isolates. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v. 44, p. 52-59, 1996.

LING, J.M. et al. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 6, p. 1693-1699, 1998.

LUNGE, V. R. et al. Desenvolvimento de testes para detecção molecular e diferenciação de sorotipos de *Salmonella* para controle de plantéis e de alimentos de origem animal. In: CONFERÊNCIA APINCO'1996 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. 1996 Curitiba. **Anais**. Curitiba: FACTA, 1996. p. 91.

MATSUOKA, D. M. et al. A nosocomial outbreak of *Salmonella Enteritidis* associated with lyophilized enteral nutrition. **J. Hosp. Infect.**, v. 58, p. 122-127, 2004.

MURAKAMI, K. et al. Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. **Epidemiology and Infection**, v. 126, p. 159-171, 2001.

NASTASI, A. et al. Epidemiological analysis of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from foodborne outbreaks occurring in Italy, 1980-1994. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v. 46, p. 377-382, 1997.

NAUERBY, B. et al. Comparison of Danish Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT9a and PT11 from hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and humans by plasmid profiling and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 10, p. 3631-3635, 2000.

NUNES, I. A. et al. Phage Typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. **J. Food Prot.**, v. 66, n. 2, p. 324-327, 2003.

OKAMURA, M. et al. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v. 45, p. 61-69, 2001.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, S. D. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005.

PETERS, T. M. et al. The Salm-gene project: a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. **Eurosurveillance**, v. 8, p. 46- 50, 2003.

PRAT, S. et al. Tipificación fágica de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 9, n. 1, p. 7-12, 2001.

RIBEIRO, A. R. et al. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Isolates, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, 2007.

RIBOT, E. M. et al. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. **Emerg. Infect. Dis.** v. 8, p. 387-391, 2002.

RIDLEY, A. M.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsedfield gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 36, n. 8, p. 2314-2321, 1998.

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

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

SILVA, E.N.; DUARTE, A. **Salmonella Enteritidis em Aves: retrospectiva da situação atual.** CONFERÊNCIA APINCO 2002 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. **Anais...** FACTA, 2002.

SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature**, London, v. 163, p. 688, 1949.

SNEATH, P. H. A.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification.** San Francisco: H. W. Freeman, 1973. 573 p. (A series of books in biology).

SOUZA, R. B. **Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Avaliação Molecular da Resistência à Quinolonas de cepas de Salmonella epidêmicas e de origem avícola isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, Brasil.** 2008. 86 f. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos]- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

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

TAVECHIO, A. T. **Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de Salmonella enterica subsp. enterica sorotipo 1,4,[5],12:i:- e de Salmonella Typhimurium** São Paulo. 2006. 147 p. Tese [Doutorado em Ciências]

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

USERA, M. A. et al. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 5, p. 768-773, 2002.

VAZ, C. S. L. **Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de Salmonella enterica subsp. enterica sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul.** 135 f. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

WEIDE-BOTJES, M.; KOBE, B.; SCHWARZ, S. Inter- and intra-phage type differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates using molecular typing methods. **Zentralbl. Bakteriol.**, Stuttgart, v. 288, p. 181- 193, 1998.

WOO, Y. K. Finding the Sources of Korean *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 Isolates by Pulsed-field Gel Electrophoresis. **Journal of Microbiology**, v. 43, p. 424-429, 2005.

ZHENG, J. et al. Enhanced subtyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1932-1935, 2007.

REFERÊNCIAS

- AHMED, R. et al. Epidemiologic Typing of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in a Canada-Wide Outbreak of Gastroenteritis due Contaminated Cheese. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2403-2406, jun. 2000.
- ALCOCER, I. R. **Sorotipagem, Fagotipagem, Caracterização Molecular de Cepas de Salmonella spp. e Avaliação Epidemiológica de Surtos Ocorridos no Paraná de 1999 a 2004**. 2004. 216 p. Tese [Doutorado em Ciência de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- ALTEKRUSE, S. F.; COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v.3, n.3, p. 285–293, jul./sep., 1997.
- AMSON, G.V.; HARACEMIV, S.M.C.; MASSON, M.L., Levantamento de dados epidemiológicos relativos à ocorrências/surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná – Brasil, no período de 1978 a 2000. **Rev. Ciênc. Agrotec.**, v. 30, n.6, p.1139-1145, 2006.
- ANDREATTI FILHO, E.L. Sorovares de *Salmonella* isolados de materiais avícolas no período de 1994 a 1999. **Revista Educação Continuada**, v.4, p. 90-101, 2001.
- ANDRIGHETO, C. **Disseminação de Salmonella Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica**. 2006. 99 p. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- ANGULO, F.J.; NARGUND, V.N.; CHILLER, T.C. Evidence of na association between use of antimicrobial agents in foods animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from humans and human consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine B**, v.51, p.374-379, 2004.
- BERCHIERI JÚNIOR, A. et al. Observations on the persistence and vertical transmission of *Salmonella enterica* serovars Pullorum and Gallinarum in chickens: effect of bacterial and host genetic background. **Avian Pathol.**, v.30, p.221-231, 2001.
- BERRANG, M. E. et al. Eggshell membrane structure and penetration by *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Food Protection**, v. 62, n.1, p.73-76, 1999.

BESSA, M. C., **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul**. 2006. 145 p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias] - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

BOONMAR, S. et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.4, p.971-974, 1998.

BOXRUD, D. et al. Comparison of Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **J. Clin. Microbiol.**, v.45, n.2, p.536-543, 2007.

BRASIL. Portaria SDA, nº 193, de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola e cria o Comitê Consultivo do PNSA. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 22 set.1994, Seção 1, p. 17309.

BRENNER, F.W. et al. *Salmonella* nomenclature. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

CALIXTO, A E. R. et al. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos, em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro – frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p. 56-61, out. 2002.

CAMARGO, N. J. et al. **Surtos de 1978 a 1997**. Curitiba: Secretaria de Saúde do Estado do Paraná. Centro de Saneamento e Vigilância Sanitária, 1998.

CAMARGO, N. J. Avaliação dos surtos de toxinfecção alimentar – Paraná – 1978 a 1999. In: SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 475 p.

CAPRIOLI, A. et al. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.295-301, 2000.

CARDINALE, E. et al. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *Enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from Humans and broiler chickens in Senegal using pulse-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. **Journal of Applied Microbiology**. v. 99, p. 968-977, 2005.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Summary of *Salmonella* serotype Enteritidis Outbreaks Reported to the CDC in 2003.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acesso em: 16 dez. 2008.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric Bacteria: 2000 Annual Report.** Disponível em: <http://www.cdc.gov/narms/annual/2005/narms_2005_annual_a.htm>. Acesso em: 16 dez. 2008.

CHEN, H.; ANANTHESWARAN, R.C.; KNABEL, S.J. Optimization of iron supplementation for enhanced detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 9, p. 1279-1285, 2001.

CLARK, C. G. et al. Emergence of *Salmonella* 4,5,12:i:- in Canada and characterization of the genetic events responsible. 2005 **Abstracts presented at the AMMI Canada – CACMID 2005 Annual Conference held in Ottawa, Ontario**, April 14-17. Disponível em: <http://www.cacmid.ca/abstracts_2005.htm>.

COGAN, T. A. et al. Growth of *Salmonella* Enteritidis in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. **International Journal of Food Microbiology**, v. 70, p. 131-141, 2001.

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

COX, N. A.; BERRANG, M. E.; CASON, J. A. *Salmonella* penetration of egg shells and proliferation in broiler hatching eggs – a review. **Poultry Science**, v. 79, p. 1571-1574, 2000.

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

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

DUBBERT, W. H. Assessment of *Salmonella* Contamination in Poultry - Past, Present and Future. **Poultry Science**, n.67, p.944-949, 1987.

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

EL-GAZZAR, F. E.; MARTH, E. H. *Salmonellae*, salmonellosis, and dairy foods: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2327–2343, 1992.

FAJARDO, T. A. et al. Penetration of *Salmonella* Enteritidis into eggs subjected to rapid cooling. **Journal of Food Protection**, v. 58, n.5, p. 473-477, 1995.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, Dês Moines, v.59, n.10, p.1091-1101, 1996.

FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 3. ed.. New York: Marcel Dekker, 1996. 1067 p.

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

FERNANDES, S.A. **Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas no Estado de São Paulo (1993-2000)**. [doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina-UNIFESP; 2004.

FERNANDES, S.A. et al. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Rev. do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.48, n. 4, p.179-184, 2006.

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

FISHER IST on behalf of the Enter-net participants. International trends in *Salmonella* serotypes 1998-2003 – A surveillance report from the Enter-Net International Surveillance Network. (www.hpa.org.uk/enter-net) **Eurosurveill** 2004; v. 9, n. 4, p. 45-47.

FORSYTHE, S.J., **Microbiologia da Segurança Alimentar**. São Paulo: Artmed, 2002. 424 p.

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

FROST, J.A.; WARD, L.R.; ROWE, B. Acquisition of a drug resistance plasmic converts *S. Enteritidis* phage type 4 to phage type 24. **Epidemiol. Infect.** v.103, p.243-248, 1989.

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

GARAIJAR, J. et al. 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. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n.12, p.5273-5281, 2000.

GASPARETTO, K.M.P.O. et al. Sorotipos de *Salmonella* isolados de carcaças de frango e avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.22, n.2, p.185-199, 2001.

GAST, R. K.; HOLT, P. S. Influence of the level and location of contamination on the multiplication of *Salmonella* Enteritidis at different storage temperatures in experimentally inoculated eggs. **Poultry Science**, v. 79, p. 559-563, 2000.

GAST, R. K.; HOLT, P. S. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella* Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. **Poultry Science**, v. 80, p. 997-1002, 2001a.

GAST, R. K.; HOLT, P. S. Multiplication in egg yolk and survival in egg albumen of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains of phage types 4, 8, 13a and 14b. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 6, p. 865-868, 2001b.

GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* 0157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. **J. Clin. Microbiol.** v. 35, p. 2977-2980. 1997.

GEIMBA, M.P. et al. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 67, n.6, p. 1229-1233, 2004.

GERMANO, P.M.L; GERMANO M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 629 p.

GERMANO, P.M.L; GERMANO M.I.S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. 3.ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GHILARDI, A. C.R., TAVECHIO, A. T., FERNANDES, S.A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 3, p. 281-286, Maio 2006.

GILLESPIE, I.A. et al. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992-2002: where are the risks? **Epidemiology and Infection**, v.133, n.5, p.795-801, 2005.

GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. Inactivation of *Salmonella* enteritidis during boiling of eggs. **International Journal of Food Microbiology**, v.82, p.13-24, 2003.

GUARD-PETTER, J. The Chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environmental Microbiology**, v.7, n.3, p.421-430, 2001.

GUERRA B. et al. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. **FEMS Microbiol Lett**, v. 190, p. 341-347, 2000.

GUPTA, A. et al. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 188, p.1707-1716, 2003.

HAO, Y. Y.; SCOUTEN, A. J.; BRACKETT, R. E. Cheesecake: A potential vehicle for salmonellosis?, **Journal of Food Protection**, v. 62,n.1, p.26-29, 1999.

HARA-KUDO, Y. et al. Laying season and egg shell cracks on the growth of *Salmonella* Enteritidis in the egg albumen during storage. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 8, p. 1134-1137, 2001.

HELMUTH, R.; SCHROETER, A. Molecular Typing Methods for *S. Enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, v.21, p.69-77, 1994.

HICKMAN-BRENNER, F.W.; STUBBS, A.D.; FARMER III, J.J. Phage Typing of *Salmonella* Enteritidis in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 2817-2823, 1991.

HOBBS B. C.; ROBERTS D., **Toxinfeções e Controle Higiênico-Sanitário de Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1999. 375 p.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.17, n.2, abr./jun, p. 55-62. 1997.

HOFER, E.; FILHO, S. J. S.; REIS, E. M. F. Sorovares de *Salmonella* Isolados de materias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.18, p. 21-27, 1998.

HUNTER, P. R. Reproducibility and Indices of Discriminatory Power of Microbial Typing Methods. **J. Clin. Microbiol.** v.28, n.9, p. 1903-1905, 1990.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Estatística da Produção Pecuária – Março de 2009. **Indicadores IBGE**. Disponível em: <www.ibge.gov.br> Acesso em: 12 abr. 2009.

JAKABI, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp. ocorridos na Grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 47-51, 1999.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6. ed. An Aspen Publication, 2000, 679 p.

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

KANASHIRO, A. M. I. et al. Isolamento de *Salmonella* Enteritidis em ovos comerciais, durante rastreamento de possível fonte de infecção em humanos. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.101, p.76-79, out. 2002.

KAYE, D. **Salmonella infections other than typhoid fever**. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J. C. Cecil textbook of medicine. 21. ed. Philadelphia, W. B. Saunders Company, p.1683-1685. 2000.

KINDE, H. et al. Pathologic and bacteriologic findings in 27-week-old commercial laying hens experimentally infected with *Salmonella* Enteritidis, phage type 4. **Avian Diseases**, v. 44, p. 239-248, 2000.

KOTTWITZ, L. **Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos.** 2005. 105 p. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2005.

KOTTWITZ, L.B.M. et al. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p. 496-498, 2008.

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. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.40, p.27-34, 1998.

LANDERAS, E.; GONZÁLES-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis: relationships between food, water and pathogenic strains. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.43, p.81-90, 1998.

LAPUZ, R. et al. An epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis contamination in a rat-infested chicken layer farm, an egg processing facility, and liquid egg samples by pulsed-field gel electrophoresis. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 69, n.6, p.649-652, 2007.

LIEBANA, E. et al. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.1, p.154-161, 2001.

LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v.44, p.52-59, 1996.

LÍRIO, V.S. et al. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* Isoladas de Alimentos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 12, p.36-42, 1998.

LUKINMAA, S. et al. *Salmonella* Enteritidis phage types 1 and 4: pheno- and genotypic epidemiology of recent outbreaks in Finland. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.7, p.2176-2182, 1999.

MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBEIT, R.D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.153-164, 1993.

MATSUOKA, D.M. et al. A nosocomial outbreak of *Salmonella Enteritidis* associated with lyophilized enteral nutrition. **J. Hosp. Infect.**, v.58, p.122-127, 2004.

MICHALSKI, C. B. et al. Use of capillary tubes and plate heat exchanger to validate U.S. department of Agriculture pasteurization protocols for elimination of *Salmonella Enteritidis* from liquid eggs products. **Journal of Food Protection**, v.62, n.2, p.112-117, 1999.

MOLBAK, K.; GERNER-SMIDT, P.; WEGENER, H.C. Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.5, 2002.

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

MURAKAMI, K. et al. Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. **Epidemiology and Infection**, v. 126, p. 159-171, 2001.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* spp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p.47-51, 2004.

NAUERBY, B. et al. Comparison of Danish Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT9a and PT11 from hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and humans by plasmid profiling and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, n.10, p.3631-3635, 2000.

NAVARRO, M.P. Infecção por *Salmonella* Enteritidis em reprodutoras pesadas na América Latina. In: CONFERÊNCIA APINCO 95 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA. 1995. Curitiba, **Anais....** Curitiba:FACTA, 1995. p.7-16.

NUNES, I.A. ***Salmonella* Enteritidis – fagotipos, susceptibilidade a drogas antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao rRNA.** 1999. 85p. Tese [Doutorado em Ciências - Microbiologia] – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n.6, dez. 2000.

OKAMURA, M. et al. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, v. 45, p. 61-69, 2001.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.

OLSEN, J.E. et al. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological Markers. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 826-835, 2003.

PERESI, J.T. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v.32, n.5, p.477-483, 1998.

PETERS, T.M. et al. The Salm-gene project: a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. **Euro Surveillance**, v. 108, p.46-50, 2003.

POPOFF, M. Y., LE MINOR, L. E.. **The genus Salmonella**. In: BRENNER, D. J, KRIEG, N.R., STALEY, J.T. (ed.). *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2.ed.; v. 2, Springer, New York, USA, p.764-799. 2005.

POWELL, N. G. et al. Subdivision of *Salmonella* enteritidis PT 4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. **FEMS Microbiol Lett.** Jun; v. 119, n. 1-2, p. 193-8, 1994.

REIS, J. D. P.; FARIA, N. C. Surtos de toxinfecção alimentar ocorridos no Distrito Federal no período de 1994 a 1997. **Revista de Saúde Pública do Distrito Federal**, v. 9, n. 3, p. 27-31, jul./set. 1998.

RIBEIRO, A.R. et al. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Isolates, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.296-299, 2007.

RIDLEY, A.M.; THRELFALL, E.J.; ROWE, B. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsedfield gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.8, p.2314-2321, 1998.

SANTOS, D.M.S. et al. *Salmonella* em carcaças de frango congelado. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 20, 2000.

SANTOS, L. R. et al. *Salmonella* Enteritidis Isoladas de Amostras Clínicas de Humanos e de Alimentos Envolvidos em Episódios de Toxinfecções Alimentares, Ocorridos entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Higiene Alimentar**, v.16, n.102/103, p.93-99, nov/dez, 2002.

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromossome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, v.37, p.67-75, 1984.

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

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

SILVA, E.N. *Salmonella enteritidis* em aves e saúde pública. **Revista Higiene Alimentar**. v.9, p.7-12, 1995.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v.4, n.2, p.85-100, 2002.

SILVA JR, E. A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SIMÕES, M. et al. Surtos Alimentares por *Salmonella* Enteritidis ocorridos na região de Campinas no período de março de 1995 a março de 2001. IN. XXI CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu, 2001.

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

SOUZA, R.B. **Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Avaliação Molecular da Resistência à Quinolonas de cepas de *Salmonella* epidêmicas e de origem avícola isoladas entre 1999 e 2006 no Estado do Paraná, Brasil**. 2008. 86p. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos]- Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

SU, L.H.; CHIU, C.H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Medical Journal**, v.30, n.3, p.210-219, 2007.

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

TAVECHIO, A.T. **Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo 1,4,[5],12:i:- e de *Salmonella* Typhimurium** São Paulo. 2006. 147 p. Tese [Doutorado em Ciências]

TASSIOS, P. T.; MARKOGIANNAKIS, A.; VATOPOLOUS, A. C.; KATSANIKOU, E.; VELONAKIS E. N.; KOUREA-KREMASTIMOU, J.; LEGAKIS N. J. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7 years period in Greece. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 1316-1321, 1997.

TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S. A. ; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B. C.; DIAS; IRINO, K. The Role of Public Health Laboratory in The Problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 38, p.119-126, 1996.

TENOVER, F. C., R. D. ARBEIT, R. V. GOERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. H. PERSING, B. SWAMINATHAN. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.** 33:2233-2239. 1995.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control Hosp. Infect.**, v.18, n.6, p.426-439, 1997.

TÉO, C. R.P.A., **Avaliação Epidemiológica dos Surtos de Salmonelose Ocorridos no Paraná Entre Janeiro de 1999 e Junho de 2001**. Londrina. 2002. 101 p. Dissertação [Mestrado em Ciência de Alimentos] - Universidade Estadual de Londrina.

TÉO, C.R.P.A., OLIVEIRA, T.C.R.M., *Salmonella* spp.: The egg as vehicle of transmission and the implications of resistance for public health. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n.2, p.195-210, 2005.

TESSI, M.A.; SALSI, M.S.; AFFER, M.I.; MOLGUILEVSKY, M.A. Drug resistance of Enterobacteriaceae isolated from chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, v.60, n.8, p.1001-1005, 1997.

TOZETTO, S.M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de *Salmonella* entérica no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004**. Curitiba. 2006. 83p. Dissertação [Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas] - Universidade Federal do Paraná. PR.

TSEN, H.Y.; LIN, J.S. Analysis of *Salmonella* Enteritidis Strains Isolated from Food-poisoning Cases in Taiwan by Pulsed Field Gel Electrophoresis, Plasmide Profile and Phage Typing. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, p.72-79, 2001.

UBA (UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA). Relatório anual 2006/2007. Disponível em: <www.uba.org.br> . Acesso em 15 nov. 2008.

USERA, M. A.; ALADUEÑA, GONZÁLEZ, R., DE LA FUENTE, M.; GARCÍA-PEÑA, J.; FRÍAS, N.; ECHEITA, M.A. Antibiotic resistance of *Salmonella* spp. from animal sources in Spain in 1996 and 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 5, p. 768-773, 2002.

VAZ, C.S.L. **Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre. 135p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

VOETCH, A.C.; VAN GILDER, T.J.; ÂNGULO, F.J.; FARLEY, M.M.; SHALLOW, S.; MARCUS, R.; CIESLAK, P.R.; DENEEN, V.C.; TAUXE, R.V. FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.127-134, 2004.

WARD, L.R.; DE SA, J.D.H.; ROWE, B. A phage typing scheme for *Salmonella* enteritidis. **Epidemiol. Infect.**, n.99, p.291-294, 1987.

WEIDE-BOTJES, M.; KOBE, B.; SCHWARZ, S. Inter- and intra-phage type differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates using molecular typing methods. **Zentralbl. Bakteriol.**, Stuttgart, v.288, p.181- 193, 1998.

WHEELER, J.G., SETHI, D., COWDEN, J.M., et al. Study of infections intestinal diseases in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. **Br. Med. J.** v.318, p.1046-050, 1999.

WINOKUR, P.L.; GRUEGGEMENN, A.; DESALVO, D.L.; HOFFMANN, L.; APLEY, M.D.; UHLENHOPP, E.K.; PEAFLLER, M.A.; DOER, G.V. Animal and human multidrug resistance, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolated expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 44, p.2777-2783, 2000.

WOO, Y.K. Finding the Sources of Korean *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 Isolates by Pulsed-field Gel Electrophoresis. **Journal of Microbiology**, 43:424-429, 2005.

ZANCAN, F.T.; JÚNIOR, A. B.; FERNÁNDEZ, S. A.; GAMA, N.M.S.Q. *Salmonella* spp. Investigation in Transport Boxes of Day-old Birds. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p.230-232, 2000.

ZHENG, J.; KEYES, 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.