LUCIANE TIEKO SHINYA ZUCON

**Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de
Salmonella spp. isoladas de suínos**

São Paulo

2008

LUCIANE TIEKO SHINYA ZUCON

Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de
Salmonella spp. isoladas de suínos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Andrea Micke Moreno

São Paulo
2008

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1971
FMVZ

Zucon, Luciane Tieko Shinya

Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos / Luciane Tieko Shinya Zucon. – São Paulo : L. T. S. Zucon, 2008.
73 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Andrea Micke Moreno.

1. Salmonelose suína. 2. AFLP. 3. PFGE. 4. Sorotipagem. 5. *Salmonella* spp. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Assistência Acadêmica

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella spp.* Isoladas de suínos", protocolo nº669/2005, utilizando 150 peças de abatedouro de suínos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella spp.* Strains isolated from swine", protocol number 669/2005, utilizing 150 parts from slaughterhouse (swine), under the responsibility of Profa. Dra. Andréa Micke Moreno, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 06 de outubro de 2005

Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ZUCON, Luciane Tieko Shinya

Título: Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* spp.
isoladas de suínos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

A Deus por seu amor e por tudo que tenho na vida...

A minha amada filha Vitória, razão do meu viver...

Ao Adriano pelo seu amor e companheirismo...

Aos meus pais pelo amor e apoio...

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, pelas oportunidades, proteção e por tudo que tenho na vida, por estar presente nos momentos de alegria e principalmente nos momentos de aflição, por me guiar neste caminho da vida e mostrar qual o objetivo maior da nossa existência...ser feliz e fazer as outras pessoas felizes...

A Profa. Dra. Andrea Micke Moreno pela orientação, confiança e apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Silvio Arruda Vasconcellos pela co-orientação e colaboração na realização desta tese.

As amigas Tânia Alen Coutinho e Cleise Ribeiro Gomes pela ajuda na realização deste trabalho e principalmente pela amizade.

A amiga Simone Midori Costa por sua amizade e apoio.

As amigas Débora, Thaís, Karina e Renata pela amizade, apoio, e troca de experiências nestes anos de convívio.

Ao Prof. Dr. Antonio José Piantino Ferreira pela amizade e sugestões.

Aos meus pais, Hirochi e Rosair pelas oportunidades que me proporcionaram, pela compreensão e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus sogros, Ana e Toninho agradeço pelo apoio e carinho.

Ao meu esposo Adriano pelo amor, compreensão, amizade, companheirismo e por compartilhar da minha vida e dos meus sonhos.

À pequena Vitória presente de Deus agradeço por alegrar minha vida, por me mostrar o verdadeiro amor e por tudo que vivemos e viveremos juntas.

As minhas sobrinhas Ariane, Carla e Carolina por fazerem parte da minha vida.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pelo apoio científico e financeiro na realização deste trabalho.

A Fundação Instituto Oswaldo Cruz pela gentileza na realização das sorotipagem das amostras.

*Não quero ser o grande rio caudaloso
Quero ser o cristalino fio d'água.*

Helena Kolody

RESUMO

ZUCON, L. T. S. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos** [Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* spp. strains isolated from pigs]. 2008. 73 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Entre os microrganismos relevantes para a segurança alimentar, bactérias do gênero *Salmonella* tem se destacado como causadoras de toxinfecções, sendo motivo de preocupação constante para a cadeia de produção de aves e suínos. Os objetivos deste trabalho foram estudar a ocorrência de *Salmonella* spp. em suínos sadios ao abate e em animais apresentando sinais clínicos de salmonelose, tipificação dos isolados através da sorotipagem, polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Foram examinados 50 animais com sintomatologia sugestiva de salmonelose de 12 granjas dos Estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul e analisadas amostras de fezes, linfonodos e suabes de carcaças de 124 animais de quatro frigoríficos do Estado de São Paulo. Dos suínos com sintomatologia clínica, 38% dos animais foram positivos para o isolamento de *Salmonella* spp., sendo selecionadas 45 cepas, classificadas como *S. Typhimurium* (29/45), *S. Choleraesuis* (9/45), *S. Infantis* (3/45) e *S. enterica* subsp. *enterica* (4/45). Dos 124 suínos sadios, 16,12% foram positivos para o agente, sendo isoladas 39 cepas que foram classificadas como *S. London* (11/39), *S. Anatum* (11/39), *S. Typhimurium* (8/39), *S. Agona* (2/39), *S. Enteritidis* (2/39) e *S. enterica* subsp. *enterica* (5/39). Através do AFLP, a caracterização genética dos isolados revelou índice discriminatório igual a 0,85 e gerou 12 perfis distintos. O índice discriminatório do PFGE foi 0,96 apresentando 31 padrões distintos. Ambas as técnicas possibilitaram uma boa correlação entre isolados, seus sorotipos e locais de isolamento, sugerindo grande potencial para sua aplicação na genotipagem de *Salmonella* spp.

Palavras-chave: Salmonelose suína. AFLP. PFGE. Sorotipagem. *Salmonella* spp.

ABSTRACT

ZUCON, L. T. S. **Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* spp. strains isolated from pigs** [Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos]. 2008. 73 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Among relevant microorganisms to food security, *Salmonella* has been highlighted as a major cause of food borne diseases, being a constant concern for poultry and pig production chain. The goal of this study was to investigate the *Salmonella* spp incidence in healthy pigs at slaughter, as well as in pigs showing salmonellosis clinical signs, characterize strains by serotyping, Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and Pulsed field gel electrophoresis (PFGE). Fifty animals, presenting salmonellosis suggestive clinical symptoms, from 12 swine herds from Sao Paulo, Parana and Rio Grande do Sul states were examined and clinical materials such as stool samples, lymph nodes and carcass swab from 124 animals from four Slaughterhouses in Sao Paulo state were analyzed. Among the pigs with clinical symptoms, 38% of the animals were positive for the *Salmonella* spp. isolation. Forty five strains were selected and classified as *S.*Typhimurium (29/45), *S.* Choleraesuis (9/45), *S.* Infantis (3/45) and *S. enterica* subsp. *enterica* (4/45). From the 124 healthy pigs studied, 16.12% were positive for the agent. Thirty nine strains were isolated and classified, by serotyping, as *S.* London (11/39), *S.* Anatum (11/39), *S.* Typhimurium (8/39), *S.* Agona (2/39), *S.* Enteritidis (2/39) and *S. enterica* subsp. *enterica* (5/39). Through AFLP, genetic characterization of isolates showed discriminatory index of 0.85 and generated 12 distinct profiles. The PFGE discriminatory index was 0.96, showing 31 distinct patterns. Both techniques allowed a good correlation between the isolates, its serotypes and isolation locations, suggesting great potential of its application in genotyping of *Salmonella* spp.

Keywords: Salmonellosis, AFLP, PFGE, Serotyping, *Salmonella* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Sistema de eletroforese em gel campo pulsado	32
Figura 2 -	Sítio de restrição da enzima <i>Hind</i> III, adaptadores e seqüência de <i>primers</i> para tipagem de <i>Salmonella</i> spp. através do AFLP.....	38
Figura 3 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5%. 2 a 16- Exemplo dos perfis obtidos através do AFLP em amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de suínos. 1 e 17- Marcador de pares de base 100bp DNA Ladder (LGC).....	48
Figura 4 -	Eletroforese em gel de agarose 1,5%. 2 e 21-Exemplo dos perfis obtidos através do AFLP em amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de suínos. 1 e 22- Marcador de pares de base 100bp DNA Ladder (LGC).....	48
Figura 5 -	Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica do AFLP com amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de casos clínicos.....	49
Figura 6 -	Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica do AFLP com amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de suínos ao abate	50
Figura 7 -	Dendrograma baseado em UPMG a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica do AFLP com amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de casos clínicos e suínos ao abate	51
Figura 8 -	Eletroforese em gel de campo pulsado. 2 a 14- Exemplo dos perfis obtidos através do PFGE com amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de suínos. 1 e 15- Marcador de pares de base λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences). 14 - <i>S. Typhimurium</i> LT2-controle positivo.....	54
Figura 9 -	Eletroforese em gel de campo pulsado. 2 a 14- Exemplo dos perfis obtidos através do PFGE em amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de suínos. 1 e 15 - Marcador de pares de base λ DNA- PFGE (Amershan Biosciences). 14 - <i>S. Typhimurium</i> LT2-controle positivo	54
Figura 10 -	Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado das amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de casos clínicos.....	55
Figura 11 -	Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado das amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de frigorífico.....	56
Figura 12 -	Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado das amostras de <i>Salmonella</i> spp. isoladas de frigorífico e casos clínicos	57

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 -	Espécies de <i>Salmonella</i> , subspecies, número de sorovares conhecidos e fontes de isolamento mais comuns.....	19
Quadro 2-	Fórmula antigênica de alguns sorotipos de <i>Salmonella</i> spp.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de animais positivos e origem dos isolados selecionados em animais com suspeita de salmonelose-São Paulo- 2008.....	43
Tabela 2 -	Sorovares de <i>Salmonella</i> spp. isolados nos animais com quadro clínico de salmonelose segundo sítio de isolamento-São Paulo- 2008..	44
Tabela 3 -	Número de animais positivos de acordo com os materiais examinados nos frigoríficos visitados e número de cepas selecionadas para caracterização-São Paulo- 2008.....	45
Tabela 4 –	Sorovares das cepas de <i>Salmonella</i> spp. isoladas em suínos ao abate segundo o sitio de isolamento-São Paulo- 2008.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucléico
Dntp	Deoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
M	Molar
mg	Miligrama (10^{-3} grama)
ng	Nanograma
ml	Mililitro (10^{-3} grama)
Mm	Milimolar (10^{-3} Molar)
PCR	Polimerase Chain Reaction
ph	Potencial Hidrogeniônico
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
V	Volt
μ M	Micromolar (10^{-6} Molar)
μ g	Micrograma (10^{-6} grama)
μ l	Microlitro (10^{-6} litro)
bp	Pares de bases
λ	Lambda
kb	Kilobase
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

Obs: Por terem seu uso consagrado na literatura técnica, algumas abreviaturas seguem as iniciais da sua escrita no idioma Inglês.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1	Classificação e Nomenclatura.....	18
2.2	Epidemiologia.....	19
2.3	Mecanismo de Patogenicidade.....	22
2.4	Patogenicidade.....	23
2.5	Sinais Clínicos e Lesões.....	24
2.6	Diagnóstico.....	25
2.6.1	Bacteriologia.....	25
2.6.2	Sorologia.....	26
2.6.3	Sorotipagem.....	27
2.6.4	Reação da Polimerase em Cadeia (PCR).....	28
2.7	Métodos de Tipificação.....	29
2.7.1	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	29
2.7.2	Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE).....	31
3	OBJETIVOS.....	33

4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	Material.....	34
4.2	Métodos.....	34
4.2.1	Bacteriológico.....	35
4.2.2	Reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	36
4.2.3	Sorotipagem dos isolados.....	37
4.2.4	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP).....	38
4.2.5	Eletroforese em gel de Campo Pulsado (PFGE).....	39
4.2.6	Determinação do índice Discriminatório (ID).....	41
4.2.7	Análise Estatística dos Fragmentos Amplificados.....	42
5	RESULTADOS.....	43
6	DISCUSSÃO.....	58
7	CONCLUSÕES.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

As salmoneloses são enfermidades provocadas por bactérias do gênero *Salmonella*, apresentando importância mundial tanto na produção de carnes quanto em saúde pública. Surtos de salmonelose estão frequentemente associados ao consumo de ovos e carne de frango, entretanto, nos últimos anos, houve um aumento no número de casos de infecção humana relacionados ao consumo de produtos de origem suína (FEDORKA-CRAY, 1994).

Suínos podem ser infectados pela grande maioria dos sorovares de *Salmonella*, não exibindo sinais clínicos da doença, porém, são portadores que eliminam a bactéria de forma intermitente ao longo da cadeia produtiva. Epidemiologicamente, estes indivíduos são importantes pela difícil identificação e responsáveis pela contaminação cruzada de carcaças e subprodutos durante o abate (FEDORKA-CRAY, 1996).

Devido à importância desse patógeno na cadeia produtiva e abatedouro, a escolha e padronização de técnicas que permitam a tipificação de amostras e sirvam como ferramenta para rastrear isolados em estudos epidemiológicos torna-se fundamental, pois técnicas adequadas permitem caracterizar e discriminar linhagens de *Salmonella* na cadeia de produção e em surtos de infecção humana.

No presente estudo, realizou-se a pesquisa de *Salmonella* spp. em animais sadios ao abate, e em suínos com sintomatologia clínica suspeita de salmonelose, os isolados obtidos foram caracterizados utilizando as técnicas do polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) e eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A suinocultura brasileira vem apresentando um desempenho crescente nos últimos anos, tanto em volume de produção como na qualidade dos produtos. Esse incremento tem-se refletido em maior participação no mercado internacional e estima-se que essa tendência levará o país a disputar a participação em mercados cada vez mais exigentes em termos de qualidade de produtos. Sendo assim, a preocupação com o controle de microrganismos transmitidos por alimentos torna-se ser um tema de relevância para toda a cadeia produtiva (CARDOSO, 2006).

A infecção por *Salmonella enterica* veiculada por alimentos é uma realidade na maioria dos países, apesar de haver surtos associados ao consumo dos mais variados alimentos, os produtos de origem animal possuem papel de destaque como fonte de infecção para o consumidor (CARDOSO, 2006).

A carne suína é a mais consumida no mundo, sendo a maior parte da carne produzida na China (60%), que segue como absoluta na produção de suínos, seguida pela União Européia, Estados Unidos da América e Brasil que ocupa o quarto lugar em produção (GIROTTTO, 2006).

As exportações brasileiras no período de 2000 a 2005 aumentaram significativamente, especialmente entre 2000 e 2002 quando o volume exportado passou de 127,9 mil toneladas para 475,9 mil toneladas. A partir de então, o crescimento anual tem sido modesto, mas sempre positivo (GIROTTTO, 2006).

O desempenho do produto brasileiro está ancorado na produtividade, competitividade, qualidade de carcaça e nos parâmetros higiênico-sanitários, levando o Brasil a adotar medidas de controle para os microrganismos que possam representar barreiras sanitárias à comercialização, como é o caso da presença de salmonela em produtos de origem animal (CARDOSO, 2006).

2.1 Classificação e Nomenclatura

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, são bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, reduzem nitratos a nitritos, fermentam glicose e raramente lactose, crescem a 35-37°C e pH 6,5-7,5 (CLARK; GYLES, 1993).

São produtoras de ácido e gás a partir de D-glicose e outros carboidratos, com exceção da *S. Typhi*, são indol negativas, produzem ácido sulfídrico (H₂S), e são capazes de utilizar citrato como única fonte de carbono, sobrevivem ao congelamento e não competem bem com outros microrganismos contaminantes em alimentos (HOLT et al., 1994).

O gênero *Salmonella* é dividido em espécies como os demais gêneros bacterianos, e possui uma classificação antigênica que determina os diferentes sorovares, sendo identificados até o momento 2463 sorovares, que são diferenciados de acordo com seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H) (BRENNER et al., 2000).

A nomenclatura de *Salmonella* é complexa e diferentes sistemas têm sido utilizados para referir-se às bactérias desse gênero, entretanto a padronização da nomenclatura para o gênero facilita a comunicação entre microbiologistas, profissionais da área da saúde e órgãos oficiais de saúde (BRENNER et al., 2000).

Segundo classificação proposta por Popoff e colaboradores (1998) o gênero divide-se em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica*, por sua vez, subdivide-se em seis subespécies, *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI), enquanto *S. bongori* tem uma única subespécie *bongori* (V) (Quadro 1).

Taxonomicamente, a classificação proposta por Popoff e Le Minor (1997) e adotada pelo CDC (Center of Disease Control and Prevention) é gênero, espécie, subespécie e sorovar. Desta forma, a nomenclatura para o sorovar Enteritidis é descrita como, *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, sendo a denominação abreviada *Salmonella* Enteritidis (BRENNER et al., 2000).

Espécies e subspécies	Numero de sorovares em cada subspécie	Fonte de isolamento usual
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (I)	1454	Animais de sangue quente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>salamae</i> (II)	489	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>arizonae</i> (IIIa)	94	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i> (IIIb)	324	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>houtenae</i> (IV)	70	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. enterica</i> subsp. <i>indica</i> (VI)	12	Animais de sangue frio e ambiente
<i>S. bongori</i> (V)	20	Animais de sangue frio e ambiente
Total	2463	

Quadro 1 - Espécies de *Salmonella*, subspécies, número de sorovares conhecidos e fontes de isolamento mais comuns (BRENNER et al., 2000)

2.2 Epidemiologia

Infecção em Humanos

Em humanos são registrados anualmente entre 40.000 a 60.000 casos de salmonelose não tifóide nos EUA, estimando um custo de U\$ 700 por caso clínico (ROBERTS, 1989).

Segundo Hald et al. (1999), na Dinamarca, entre as fontes de infecção humana, 40-45% são provenientes de ovos e 10-15% de produtos de origem suína, sendo assim, a segurança dos produtos de origem animal através do controle da bactéria dentro das criações e abatedouros, torna-se um ponto de fundamental importância.

Entre os sorotipos capazes de infectar humanos, a *S. Enteritidis* e a *S. Typhimurium* são responsáveis pela maioria dos casos de doença (CDC, 2007).

Nos países em desenvolvimento como o Brasil, as doenças diarreicas assumem maior importância devido fatores como consumo de água não tratada, falta de saneamento básico, desnutrição e falta de diagnóstico, pois o sistema de

notificação de doenças transmitidas por alimentos é precário e os números reais de casos de infecção por *Salmonella* são desconhecidos (JAKABI et al., 1999).

Em estudo conduzido por Fernandez et al. (2006) no estado de São Paulo no período de 1996 a 2003, foram estudadas 3554 isolados de *Salmonella* spp. de origem humana, sendo os sorovares *S. Enteritidis* (67,4%), *S. Typhimurium* (5,2%), *S. enterica* subsp *enterica* 4,5,12:i:- (5,1%), *S. Typhi* (4,0%), *S. Dublin* (2,5%), *S. Infantis* (2,3%) e *S. Agona* (1,4%) os de maior ocorrência.

As carnes e derivados de aves e suínos são alimentos bastante susceptíveis à contaminação por salmonela, esse fato está relacionado à dificuldade de manter os lotes livres do agente no sistema vertical de produção e distribuição (D'AOUST, 1994).

Pequeno número de bactérias viáveis pode oferecer risco para a ocorrência da infecção, uma vez que as condições de armazenagem, distribuição e preparação dos alimentos podem favorecer a multiplicação do agente, permitindo alcançar a dose infectante para humanos. A manipulação dos alimentos e os hábitos alimentares como a ingestão de produtos de origem animal mal cozidos, aumentam as chances de contaminação, sendo a dose infectante dependente do status imunológico do hospedeiro, da virulência do agente e da composição química do alimento, dessa forma, a população de maior risco são os neonatos, crianças e idosos devido à imaturidade ou debilidade do sistema imunológico (D'AOUST, 1997).

Em humanos a infecção ocorre via fecal-oral, sendo a dose necessária de 10^5 UFC/g. O período de incubação em humanos para amostras não tifóides é de 12 a 72 horas e os sintomas mais comuns são cefaléia, náusea, vômito, cólica abdominal, febre moderada e diarreia com duração de até duas semanas, porém a fase aguda dura de dois a sete dias. Na maioria dos casos a recuperação é espontânea, sendo a maior parte dos registros hospitalares e letalidade, referentes à população de risco (CDC, 2007).

Infecção em Suínos

Em suínos, a importância da infecção por salmonela está relacionada a dois fatores, a manifestação clínica da doença e a presença do agente em carcaças e produtos derivados que podem levar as intoxicações alimentares em humanos (SCHWARTZ, 2000).

A infecção em suínos pode ocorrer por diversos sorovares que não causam doença, mas que representam uma fonte de contaminação para a carne suína, pois alguns animais passar despercebidos por todas as fases zootécnicas, permanecendo no estado de portadores assintomáticos por período indeterminado, e no momento do abate, se expostos a situações estressantes, eliminam a bactéria através das fezes e contaminam animais livres (SCHWARTZ, 2000).

A introdução da salmonela na cadeia de produção pode ocorrer por diferentes maneiras, as fontes de infecção podem ser animais pertencentes ao próprio grupo, animais de outros grupos da mesma granja, animais de reposição ou fatores externos como ração, pessoas e vetores (VAN DER GAAG et al., 2004).

Letellier et al.(1999) encontraram 15,9% das fêmeas de reposição e 21,9% das unidades de terminação de leitoas positivas para a bactéria no Canadá. No Rio Grande do Sul, Silva et al. (2003) encontraram uma prevalência média de 32% de leitoas de reposição positivas.

Diversos pesquisadores atribuem importância significativa à introdução de salmonela na granja através da alimentação dos suínos, em alguns casos, tem sido demonstrada a relação entre sorovares encontrados em amostras de ração com aqueles recuperados de animais (FEDORKA-CRAY et al., 1997). Embora ingredientes de origem vegetal também possam servir de fonte de contaminação para a ração, a utilização de farinhas de origem animal é apontada como a principal causa da introdução da bactéria na granja (SCHWARTZ, 2000).

Estima-se que 15% a 30% de todas as infecções no período de terminação podem ser atribuídas à ração contaminada, sendo importante considerar que a ração possui um significativo papel na propagação da salmonela na granja (BERENDS et al., 1996).

Medidas para manter a alimentação animal livre da contaminação por salmonelas requerem o tratamento térmico, proteção da ração do contato com

reservatórios como pássaros, roedores e materiais contaminados ou contaminação residual em caminhões (FEDORKA-CRAY et al., 1997).

Para suínos os sorovares associados à ocorrência de salmonelose são *S. Typhimurium* e *S. Choleraesuis* (SCHWARTZ, 2000).

2.3 Mecanismos de Patogenicidade

A maioria dos fatores de virulência de *Salmonella enterica* são determinados por genes cromossomais, muitos destes localizados dentro de ilhas de patogenicidade (SPI), que são grandes regiões do cromossoma (10 a 200 pb) que carregam um ou mais genes de virulência e estão presentes no genoma de bactérias patogênicas e localizadas em regiões adjacentes a genes de RNA transportador (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Existem mais de 200 fatores de virulência associados com a infecção por *Salmonella* spp., no entanto poucos foram completamente caracterizados. Os fatores que promovem a virulência das salmonelas patogênicas são os envolvidos na adesão, invasão, citotoxicidade e resistência à morte intracelular e a ação conjunta destes fatores promovem a doença (SCHWARTZ, 2000).

Os genes necessários para o fenótipo de invasão estão agrupados em uma região do cromossoma denominada Ilha de Patogenicidade 1 (SPI-1), presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies e sorotipos de *Salmonella enterica* já analisados (OHL; MILLER, 2001).

A SPI-1 codifica genes responsáveis pela invasão das células hospedeiras não fagocíticas, apoptose de macrófagos “in vitro”, síntese de fímbrias e ativação do sistema AMP cíclico (OHL; MILLER, 2001).

As ilhas de patogenicidade 2, 3 e 4, são necessárias para a multiplicação e sobrevivência da bactéria no interior da célula hospedeira, a ilha de patogenicidade 5 media a inflamação e secreção de cloro caracterizando a fase entérica da doença (OHL; MILLER, 2001). Outras cinco regiões SPI-6 a SPI-10, estão envolvidas com a codificação de fímbrias, resistência à bacteriocinas e produção de toxinas (VAN ASTEN; VAN DIJK, 2005).

2.4 Patogenicidade

As características da patogenia e manifestações clínicas da infecção por *Salmonella* spp. são variáveis, sendo a severidade influenciada pelo sorotipo, virulência, resistência natural e adquirida do hospedeiro e dose infectante (SCHWARTZ, 2000).

As infecções causadas por *Salmonella* apresentam uma patogenia complexa, sendo o primeiro passo no processo de doença, a transmissão da bactéria para um hospedeiro suscetível. A dose necessária para iniciar a infecção é de 10^5 a 10^{10} UFC variando conforme a cepa e o estado geral do hospedeiro (DARWIN; MILLER, 1999).

Uma quantidade maior de inoculo é necessário para superar a barreira de acidez do estômago e competir com a microbiota do intestino, mas a dose infectante é reduzida quando a bactéria é ingerida com alimentos que atravessam o estômago rapidamente, como líquidos, ou com alimentos que neutralizam a acidez estomacal (DARWIN; MILLER, 1999).

A *S. Choleraesuis* é o sorovar que possui maior capacidade invasiva, não necessitando de grande carga bacteriana para provocar a doença, este sorovar possui predileção pelo íleo e cólon, invade enterócitos e células M, que estão justapostas às Placas de Peyer. A *S. Typhimurium* é menos invasiva e necessita de maior quantidade de células bacterianas para induzir a doença, a principal porta de entrada é através das Placas de Peyer (KICH, 2007).

A principal via de infecção é fecal-oral por meio da ingestão de água e alimentos contaminados. Secreções orofaringeanas também podem conter *Salmonella* spp., facilitando a transmissão direta (via focinho-focinho) e indireta através de aerossóis de um suíno para outro (SCHWARTZ, 2000).

Após a entrada da bactéria no organismo hospedeiro, para o estabelecimento da infecção, os processos de aderência e invasão das células presentes no intestino são fundamentais (SCHWARTZ, 2000).

A adesão de *Salmonella Typhimurium* ou *Salmonella Choleraesuis* em culturas de células provoca uma alteração na superfície da célula hospedeira, promovendo um aspecto pregueado, resultando na internalização da bactéria dentro de uma vesícula endocítica. Esse processo é acompanhado por extensivo rearranjo

da actina próximo ao local de invasão da bactéria e é mediado por um grupo de genes designados *inv* que são altamente conservados em *Salmonella* spp. Após a entrada do microorganismo à superfície celular, a organização da actina retorna ao normal (DARWIN; MILLER, 1999).

A interação da *Salmonella* com o epitélio resulta não somente na invasão das células epiteliais, como também na produção de uma variedade de moléculas sinalizadoras nas células epiteliais que estimula a produção de interleucina-8 (IL-8) e do quimiorreceptor epitelial induzido por patógeno resultando na inflamação e migração de leucócitos através do epitélio. A produção de prostaglandinas pelos leucócitos induz o aumento na atividade de adenilato ciclase nas células intestinais, inibindo a absorção do sódio e aumentando a secreção do cloreto, provocando a diarreia (DARWIN; MILLER, 1999).

Outra característica importante da *Salmonella* spp. é a capacidade de sobreviver no interior de fagócitos, estudos realizados com *Salmonella* Typhimurium mostraram que esse é um processo complexo envolvendo cerca de 200 genes que auxiliam a bactéria a sobreviver à exposição a formas reativas de oxigênio, baixo pH, defensinas e resistência à antimicrobianos (HENSEL, 2004).

2.5 Sinais Clínicos e Lesões

Os quadros clínicos observados nas infecções por *Salmonella* estão relacionados à septicemia ou a diarreia. Na septicemia, o quadro normalmente é agudo, alguns animais morrem subitamente e outros apresentam sinais de febre e cianose nas extremidades, aumento da temperatura corporal (40,5 a 41° C), queda no apetite, dificuldade de locomoção, enfraquecimento, tendência a se amontoarem e ocasionalmente diarreia. A pele apresenta áreas avermelhadas, principalmente nas orelhas, barriga e região inguinais que posteriormente tornam-se cianóticas. A maioria dos animais morre em um a quatro dias após o surgimento dos sintomas, sendo rara a recuperação (KICH, 2007).

A forma diarreica inicia-se com aumento na temperatura corporal, seguida de queda no apetite e diarreia. As fezes são líquidas, fétidas, amareladas, esverdeadas ou sanguinolentas, com estrias de material necrótico. A diarreia apresenta-se de

forma intermitente podendo durar várias semanas, resultando em perda de peso, refugagem, sendo que a mortalidade varia de 20 a 40% (KICH, 2007).

Na forma aguda da doença, predomina um quadro de gastroenterite hemorrágica, observando-se na mucosa estomacal, focos hemorrágicos e áreas com perda da mucosa. O baço apresenta-se aumentado, os rins e a bexiga apresentam hemorragia, petéquias e linfonodos infartados. No pulmão, observam-se focos purulentos e áreas hemorrágicas disseminadas, no coração ocorre excesso de fluido no saco pericárdico e petéquias no epicárdio (KICH, 2007).

Na forma crônica ou enterocolítica, a mucosa do ceco e cólon, apresenta áreas de tecido necrosado, variando de pequenos círculos a grandes áreas de tecido necrótico e fibrinoso. A espessura da mucosa apresenta-se aumentada, com coloração esbranquiçada ou amarelada. O conteúdo é líquido fétido, contendo grumos de tecido necrótico e os linfonodos mesentéricos estão aumentados (KICH, 2007).

2.6 Diagnóstico

A metodologia recomendada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento para pesquisa de *Salmonella* spp. em alimentos é o método clássico de isolamento (BRASIL, 1997). No entanto, a técnica é trabalhosa e demorada necessitando de várias etapas de cultivo, devido a isto, outras metodologias de detecção mais rápidas e menos laboriosas têm sido propostas com a finalidade de diminuir o tempo de processamento laboratorial. Entre estas técnicas estão os testes sorológicos e análise de DNA (SCHWARTZ, 2000).

2.6.1 Bacteriologia

O exame bacteriológico pode ser realizado a partir de material clínico como fezes e suabes retais no caso de animais vivos, ou em caso de animais necropsiados, os órgãos a serem utilizados incluem fragmentos do intestino delgado

e grosso, pulmão, fígado, baço e linfonodos mesentéricos. O isolamento do agente tem sido considerado a técnica de referencia para definir o status de infecção por salmonela em animais (GALLAND et al., 2000). Entretanto, o isolamento do agente tem suas limitações, uma vez que a presença da bactéria nas fezes ou linfonodos indica apenas que esta sendo excretada pelo suíno no momento da amostragem, não indicando a ocorrência de quadro clínico de salmonelose. Outra limitação é a baixa sensibilidade do método de cultivo, associado à excreção fecal intermitente de baixas unidades formadoras de colônia de *Salmonella* spp. no caso de animais portadores assintomáticos (NIELSEN et al., 1995; GALLAND et al., 2000).

A baixa sensibilidade da técnica pode ocorrer devido à baixa viabilidade das células bacterianas dificultando o crescimento *in vitro*, além disso, as bactérias da microbiota podem competir com a *Salmonella* spp. pelo meio de cultura (CARDOSO, 2006).

Para aumentar o sucesso do isolamento, utiliza-se uma metodologia que consiste de três estágios: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e isolamento em meio sólido (SCHWARTZ, 2000).

O pré-enriquecimento tem como objetivo recuperar células lesadas, o enriquecimento seletivo visa inibir a microbiota acompanhante e promover a multiplicação do agente e o meio sólido seletivo tem por objetivo promover o desenvolvimento de colônias com características típicas para posterior confirmação bioquímica e sorológica (D' OUST, 1990).

2.6.2 Sorologia

Os testes sorológicos ou imunoensaios são técnicas para detecção e a quantificação de antígenos e anticorpos ou outras substâncias que desempenham o papel de antígeno tais como hormônios, citocinas e receptores de células. Os testes sorológicos têm se tornado cada vez mais refinados e de simples execução, porém para garantir a qualidade dos resultados é necessário rigoroso controle e cuidadosa interpretação. Testes sorológicos são utilizados com sucesso na pesquisa de anticorpos e tornaram-se importantes em estudos visando um diagnóstico individual e de pesquisa epidemiológica (TORENSMA et al., 1992).

A detecção de anticorpos contra *Salmonella* spp. em suínos pode ser empregada para identificar plantéis positivos para o agente, avaliar a prevalência da bactéria em determinada região ou rebanho e estudos epidemiológicos. O primeiro imunoensaio para *Salmonella* spp. foi realizado em 1977, e desde então, diversos testes ELISA têm sido desenvolvidos, usando-se tanto anticorpos policlonais como monoclonais para detectar a maioria dos sorovares do agente (TORENSMA et al., 1992).

Em estudos realizados no Brasil, Kich et al. (2005) concluíram que o teste de ELISA indireto utilizando o sorovar Typhimurium que possui os antígenos comuns aos sorovares prevalentes na Região Sul do Brasil representa uma boa ferramenta para estabelecer a soroprevalência de *Salmonella* spp. em granjas de suínos

2.6.3 Sorotipagem

A parede celular dos microrganismos contém numerosos lipopolissacarídeos e proteínas que possuem diferenças em seus componentes, estas estruturas têm atividade antigênica e são utilizadas para classificação do agente. Baseado na detecção dos antígenos externos, uma única espécie pode ser dividida em centenas ou milhares de diferentes sorotipos ou sorovares. A caracterização da *Salmonella* spp. em diferentes sorovares é realizada através da determinação dos antígenos somáticos ou de parede celular (O), flagelares (H) e o antígeno de virulência (Vi) (BRENNER et al., 2000).

A especificidade do antígeno O é determinada pela estrutura e composição do lipopolissacarídeo (LPS) da parede celular e os diferentes antígenos são denominados por números arábicos, como por exemplo, 4,12. Os antígenos O podem variar pela lisogenia e isso pode resultar na mudança do sorovar, outra variação no antígeno O pode resultar na mudança do aspecto da colônia da forma lisa para forma rugosa, sendo essa mudança acompanhada pela perda deste antígeno, e algumas vezes, da virulência e dificultando o diagnóstico preciso do sorotipo (BRENNER et al., 2000).

O antígeno H é termolábil e composto de proteínas que podem ser em uma fase (monofásicas) ou duas fases (difásicas), sendo que nos antígenos difásicos,

somente uma das fases é expressa a um dado momento. Antígenos da fase 1, são assinalados com letras minúsculas (exemplo a, b) e aqueles de fase 2 são expressos em números arábicos ou letras minúsculas. Os antígenos flagelares da fase 1 e fase 2 são determinados por 2 genes, H1 e H2 que codificam a proteína denominada flagelina. O antígeno de virulência (Vi) só é encontrado na *S. Typhi*. A fórmula antigênica (sorotipo ou sorovar) de algumas salmonelas mais comuns estão listadas no quadro 2.

Sorotipo	Fórmula antigênica
<i>S. Choleraesuis</i>	6,7:c-1,5 (difásica)
<i>S. Dublin</i>	9,12:g,p-(monofásica)
<i>S. Pullorum</i>	9,12:-(imóvel)
<i>S. Typhimurium</i>	1,4,5,12:i-1,2 (difásica)

Quadro 2 - Fórmula antigênica de alguns sorotipos de *Salmonella* spp.

2.6.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de DNA a partir de uma seqüência alvo. A especificidade do teste é obtida a partir da utilização de seqüências complementares ao DNA do agente pesquisado. Em um ensaio de PCR, caso haja complementaridade entre os iniciadores e o DNA da amostra analisada, haverá ligação de ambos, seguida pela reação de síntese de DNA *in vitro*. A repetição desta reação por diversos ciclos (30-40), dará origem a bilhões de cópias alvo num processo de amplificação conferindo extraordinária sensibilidade (IKUTA et al., 2001).

A PCR pode ser aplicada não somente a detecção direta do agente em amostras clínicas, mas têm sido de grande auxílio na identificação do gênero *Salmonella* em isolados e é empregada em vários métodos de genotipagem ou caracterização molecular (IKUTA et al., 2001).

2.7 Métodos de Tipificação

As técnicas convencionais de tipagem bacteriana como a sorotipagem, fagotipagem e determinação do padrão de suscetibilidade a antimicrobianos, baseiam-se na presença ou ausência de atividades metabólicas ou biológicas expressas pelos microrganismos (FARBER, 1996). Embora esses métodos fenotípicos sejam valiosos para caracterização das bactérias, eles apresentam limitações, pois necessitam de reagentes especializados como anti-soros, estirpes bacterianas para propagar fagos que estão disponíveis somente em laboratórios de referência, além disso, as características fenotípicas podem não ser expressas de forma estável em determinadas condições ambientais ou de cultivo dificultando a caracterização do agente (FARMER, 1996).

Com a disseminação dos métodos para análise de DNA, técnicas genotípicas têm sido aplicadas à tipagem bacteriana apresentando diversas vantagens sobre as técnicas convencionais, entre as vantagens esta o fato do DNA sempre poder ser extraído das bactérias e o poder discriminatório dos métodos de análise de DNA ser maior do que os procedimentos fenotípicos (FARMER, 1996).

A caracterização molecular oferece uma grande variedade de metodologias com especificidade, reprodutibilidade e poder discriminatório variável, muitas das quais tem sido descritas para diferenciar amostras de *Salmonella* fenotipicamente semelhantes com sucesso (HUNTER, 1990). A seguir serão descritas duas destas metodologias que serão empregadas neste estudo.

2.7.1 Polimorfismo do comprimento de fragmentos amplificados (AFLP)

A técnica de AFLP pode ser utilizada para identificação e tipagem possuindo capacidade de discriminação taxonômica para espécie, subespécie e cepa, não sendo capaz de discriminar família e gênero, uma vez que em amostras com menos de 40% de similaridade, poucas bandas podem ser comparadas dentro dos grupos (JANSSEN et al., 1997; SAVELKOUL et al., 1999). A técnica foi desenvolvida para

tipagem de plantas e tem sido utilizada também para animais, e DNA de procariotos (VELAPPAN, et al., 2001).

O AFLP tem sido amplamente utilizado em estudos envolvendo a epidemiologia molecular de bactérias gram-negativas e gram-positivas, combinando diversas vantagens das diferentes técnicas, o que resulta na elevada capacidade de discriminação (DESAI et al., 1988; JANSSEN et al., 1997; KOELEMAN et al., 1997; KOELEMAN et al., 1998;).

Assim como em outras técnicas de tipagem, as variações nos resultados do AFLP são baseadas em mutações nos sítios de restrição ou variação no tamanho dos fragmentos de restrição (VANEECHOUTTE, 1996). A limitação básica do AFLP e de outros procedimentos de tipagem genômica consiste na necessidade de isolamento do organismo a ser testado, já que o DNA de outras fontes interfere nos resultados (SAVELKOUL et al., 1999).

O AFLP envolve a digestão do DNA bacteriano purificado com uma enzima de restrição, seguido pela ligação dos fragmentos resultantes a um oligonucleotídeo adaptador de fita dupla, o qual é complementar a seqüência de bases do sítio de restrição. Os adaptadores são desenhados de forma que os sítios de restrição originais não sejam restabelecidos após a ligação, o que impede uma nova digestão enzimática. A amplificação seletiva destes fragmentos através da PCR é realizada utilizando-se pares de *primers* complementares a seqüências dos adaptadores. Os fragmentos de DNA amplificado pela PCR são analisados através da eletroforese em gel de agarose (MCLAUHLIN et al., 2000).

Na literatura tem sido descritas duas variações da técnica, uma com duas enzimas de restrição diferentes e dois *primers* para amplificação e a segunda com um único *primer* e enzima de restrição (CROSA et al., 1973; HABU et al., 1997; HEUN et al., 1997; DUIM et al., 1999).

2.7.2 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

Devido ao tamanho do DNA cromossômico de bactérias, normalmente entre 800-8000 kb, a restrição com endonucleases que reconhecem seqüências de bases muito freqüentes origina perfis muito complexos. Por outro lado, se a endonuclease originar poucos fragmentos, estes terão uma massa molecular muito elevada, dificultando a sua separação por eletroforese convencional (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

Nos métodos eletroforéticos convencionais, a separação de moléculas lineares de DNA (até 50 kb) é efetuada em função da sua massa molecular, quando se aplica um campo elétrico unidirecional, no entanto, a separação de fragmentos de grandes dimensões é possível através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

Na eletroforese em gel de campo pulsado utilizam-se campos elétricos alternados que forçam as moléculas de DNA a mudar continuamente de direção (Figura 1). O limite de resolução é atingido quando o raio de rotação da molécula de DNA excede o tamanho médio do poro do gel forçando as moléculas a percorrerem um caminho sinuoso e a mobilidade eletroforética passa a ser independente da massa molecular (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

A separação do DNA é baseada no tempo em que moléculas de maior dimensão levam a mudar de direção de migração, quanto maior for a molécula de DNA, maior é o tempo necessário para a sua reorientação, sendo na diferença do tempo de reorientação que se baseia a separação das moléculas. O parâmetro crítico que afeta a separação das moléculas é o tempo do pulso, que é a duração da aplicação do campo elétrico numa dada direção (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

A preparação das moléculas de DNA para a aplicação da técnica de PFGE envolve três etapas: a imobilização das células numa matriz de agarose evitando quebras não específicas do DNA devido à agitação mecânica; a lise das células seguida da extração e purificação do DNA a partir das células oclusas na matriz de agarose, e por último a incubação com a enzima de restrição selecionada. Por ser uma técnica reprodutível e com ótimo poder discriminatório, a técnica de eletroforese em campo pulsado tem sido muito utilizada em estudos epidemiológicos e na

distinção de isolados clínicos das mais variadas espécies bacterianas (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

Figura 1 - Sistema de eletroforese em gel de campo pulsado

3 OBJETIVOS

1. Isolamento de *Salmonella* spp. de suínos com quadro clínico sugestivo de salmonelose.
2. Isolamento de *Salmonella* spp. de suínos clinicamente sadios no momento do abate, a partir de suabes de carcaça, fezes e linfonodos mesentéricos.
3. Caracterização fenotípica dos isolados através de provas bioquímicas e sorotipagem.
4. Caracterização genotípica de *Salmonella* spp. através das técnicas de AFLP e PFGE.
5. Comparar técnicas de AFLP e PFGE e avaliar qual a mais discriminatória.
6. Determinar se existe correlação entre os agrupamentos formados a partir das técnicas genotípicas e a divisão definida pela sorotipagem.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo foi conduzido com animais provenientes de quatro frigoríficos sob Inspeção Federal, localizados no estado de São Paulo denominados A, B, C e D, e com suínos apresentando sinais clínicos de salmonelose provenientes de granjas do estado de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás.

4.1 Material

Na avaliação realizada em abatedouro foram examinadas amostras pareadas de linfonodos mesentéricos, fezes e suabes de carcaças de 124 animais sadios, sendo que em cada frigorífico foram colhidas aleatoriamente amostras de 31 animais oriundos de dois lotes diferentes. Os linfonodos mesentéricos, amostras de fezes e suabes de carcaça foram colocados individualmente em bolsas plásticas esterilizadas, identificadas e conservadas sob refrigeração.

As amostras originadas de casos clínicos com suspeita de salmonelose foram obtidas na rotina de diagnóstico do Laboratório de Sanidade Suína- VPS- FMVZ no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2005. Neste período foram examinados 50 animais com suspeita clínica da infecção.

4.2 Métodos

Seqüência cronológica das metodologias utilizadas: Bacteriológico e bioquímica, PCR, sorotipagem, AFLP e PFGE.

4.2.1 Bacteriológico

As amostras foram submetidas ao protocolo de isolamento previamente descrito (HOLT et al., 1994).

As bolsas esterilizadas contendo respectivamente o suabe de carcaça ou 25 g de conteúdo intestinal ou 25g dos linfonodos mesentéricos de cada animal receberam 225 ml de água peptonada tamponada com novobiocina 0.004%. As amostras foram homogeneizadas em *stomacher* e incubadas a 37°C por 24 horas (etapa de pré-enriquecimento).

Após este período, alíquotas de 1 ml de cada amostra foram semeadas em 9 ml de caldo tetracionato com iodo e mantidos a 37°C por 24 horas. A partir do tubo de enriquecimento seletivo as amostras foram semeadas em ágar Xilose Lisina Tergitol-4 (XLT4) e ágar MacConkey e foram incubadas por 24 horas a 37° C.

As colônias lactose negativas em ágar MacConkey e as que apresentaram precipitação de H₂S em meio XLT4 foram submetidas às provas bioquímicas para identificação inicial segundo descrito por Quinn et al. (1994).

A partir dos animais com sintomatologia de salmonelose foram examinadas amostras de fezes, suabe da cavidade torácica, pulmão e linfonodos mesentéricos. Estas amostras foram semeadas em 9 ml de caldo tetracionato com iodo e mantidos a 37° C por 24 horas.

A partir do tubo de enriquecimento seletivo as amostras foram semeadas em agar Xilose Lisina Tergitol-4 (XLT4) e ágar MacConkey e foram incubadas por 24 horas a 37°C. As colônias lactose negativas em ágar MacConkey e as que apresentaram precipitação de H₂S em meio XLT4 foram submetidas às provas bioquímicas para identificação inicial segundo descrito por Quinn et al. (1994).

Colônias com resultado bioquímico sugestivo de *Salmonella* spp. foram submetidas a Reação em Cadeia pela Polimerase .

4.2.2 Reação em cadeia pela Polimerase (PCR)

Extração do DNA bacteriano

Colônias com resultado bioquímico sugestivo de *Salmonella* spp. foram submetidas a extração do DNA bacteriano para realização da reação em cadeia pela polimerase (PCR).

O protocolo para extração de DNA detalhado a seguir foi baseado no descrito por Boom et al. (1990). A um microtubo foi adicionado 200µl da cultura bacteriana, o microtubo foi mantido à 37°C por 60 minutos e após este período foi adicionado 1 ml do tampão de lise (Tiocianato de Guanidina 120gr, Triton 100X 1ml, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 111,2 ml, EDTA 0,5M 8,8 ml) e 40 µl da suspensão carreadora (1gr Terra diatomácea, HCl 50 µl e 5 ml água ultrapura).

O microtubo foi agitado por 1 minuto e deixado sobre a bancada por 10 minutos. Passado este período o microtubo foi centrifugado por 90 segundos a 14.000 rpm. O sobrenadante obtido foi descartado e ao pélete formado foi adicionado 1 ml do tampão de lavagem (Tiocianato de Guanidina 120gr, Tris-HCl 0,1 M [pH 6,4] 100ml). O microtubo foi então agitado por 30 segundos e centrifugado por 90 segundos, o sobrenadante obtido foi descartado e o pélete novamente submetido a este procedimento. O pélete obtido após esta etapa foi submetido a duas lavagens com etanol (70%) e uma lavagem com acetona. Os microtubos contendo o pélete tratado com acetona foram mantidos em estufa a 37° C por 20 minutos. Após a completa secagem do pélete foi adicionado 100µl de tampão de eluição (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA [pH 8,0]) ao microtubo, este foi agitado por 1 minuto e mantido à 56 °C por 10 minutos. Passado este tempo o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 14.000 rpm, o sobrenadante contendo o DNA foi armazenado em tubos limpos e numerados. As amostras de DNA foram mantidas a -20°C até sua utilização.

Amplificação do DNA

Foram utilizados para identificação dos isolados os primers específicos para *Salmonella* spp. descritos por Stone et al. (1994). Para a reação em cadeia pela polimerase foi adicionado ao microtubo 20 pmoles dos primers Sal A (5' TGCCTACAAGCATGAAATGG 3') e Sal B- (5'AAACTGGACCACGGTGACAA 3'), 0,5 unidades de Taq DNA polimerase, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada deoxiribonucleotídeo trifosfato, 5 µl da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25 µl.

Para amplificação do DNA de *Salmonella* spp. o termociclador foi programado para 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e um ciclo final de 72°C por 5 minutos.

A cada amplificação realizada foi adicionado um controle positivo (contendo o DNA do agente) e um controle negativo.

Todas as colônias positivas através da PCR foram enviadas para Fundação Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro para serem sorotipadas.

4.2.3 Sorotipagem dos isolados

As amostras caracterizadas como *Salmonella* spp. através da bioquímica e da PCR foram estocadas em ágar nutriente e enviadas ao Departamento de Bacteriologia da Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ- Rio de Janeiro) para realização da sorotipagem.

4.2.4 Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

Restrição enzimática

Após a identificação dos sorotipos os isolados foram submetidos a extração de DNA para realização do AFLP.

Para restrição do DNA bacteriano, cinco µl de amostra foi adicionada a um microtubo contendo 24U de *Hind*III e água até o volume final de 20 µl. O tubo foi incubado à 37°C por 18 a 24 horas.

Uma alíquota de 5 µl do DNA digerido foi adicionada à um microtubo contendo 0.2 µg dos adaptadores ADH1 e ADH2, 1U de T4 DNA ligase, tampão ligase 1X e água até o volume final de 20 µl. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. Após este período, o DNA ligado foi aquecido à 80 °C por 10 minutos e diluído 1/5 em água ultrapura.

A PCR foi realizada utilizando-se 5 µl do DNA ligado diluído, 2.5 mM de MgCl₂, 300 ng do *primer* (HI-G), 1.0 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e água até o volume final de 50 µl. A reação foi submetida à denaturação à 94° C por 4 minutos seguido por 35 ciclos de 1 minuto à 94° C, 1 minuto à 60° C e 2,5 minutos à 72° C. A seqüência de bases dos *primers* utilizados para ligação e amplificação e sua posição relativa ao sítio de restrição da enzima *Hind* III esta apresentado na figura 2.

1. Fragmento <i>Hind</i> III	5' AGCTT-----A 3'
	3' A-----TTCGA 5'
2. Adaptador	ADH1 5' ACGGTATGCGACAG 3'
	ADH2 3' GAGTGCCATACGCTGTCTCGA 5'
3. Primer específicos HI-G	5'GGTATGCGACAGAGCTTG 3'

Figura 2- Sítio de restrição da enzima *Hind* III, adaptadores e seqüência de *primers* para tipagem de *Salmonella* spp. através do AFLP.

Detecção do produto de amplificação

A detecção dos produtos de amplificação da PCR e do AFLP foi realizada através da eletroforese em gel de Agarose 1,5% utilizando-se tampão TBE 0,5X (0,04 M tris-acetato [pH 8,5], 0,002 M de EDTA).

Após a corrida o gel foi colocado em uma solução de Brometo de Etídio (5µg / ml) por 15 minutos e descorado em água por 20 minutos. O gel foi então fotografado através do Sistema "Image Master" (Amershan-Pharmacia Biothec). Os fragmentos foram identificados utilizando o marcador de pares de base 100bp.

4.2.5 Eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

As amostras isoladas e identificadas como *Salmonella* spp. foram preparadas para serem analisadas através do PFGE segundo descrito por Liu e Sanderson (1992), com algumas modificações.

Os blocos de agarose contendo o DNA genômico foram preparados com cultivo bacteriano na concentração 1×10^9 UFC/ml em caldo BHI. O volume de 1,4 ml das amostras foi adicionado a um microtubo e o mesmo foi centrifugado a 6800 rpm por 20 segundos, o sobrenadante foi descartado. O pélete obtido foi lavado duas vezes com 1 ml de tampão PBS a 4º C. Após a última lavagem foi adicionado ao pélete 350 µl de tampão PIV (0,01 M Tris-HCl [ph 7.6], 1 M NaCl, 0,5 Sarcosyl) a 4º C e esta suspensão bacteriana foi misturada a 350 µl de agarose a 2%. A mistura foi mantida a 37ºC até a confecção dos blocos. Para a confecção destes, 100 µl da mistura de agarose e cultura bacteriana foram adicionados ao molde. Após solidificação dos blocos estes foram acondicionados em microtubos a 4ºC por 30 minutos.

Extração do DNA genômico

Os blocos de agarose contendo as amostras bacterianas foram submetidos à purificação do DNA genômico. Cinco blocos de cada isolado foram incubados em uma solução de lise (1960 µl de tampão de lise + 40 µl de lisozima) por 2h a 37° C. Em seguida a solução de lise foi substituída pela solução ESP (1990µl de tampão ES + 10 µl de proteinase K) e os blocos mantidos em banho-maria a 57° C overnight.

Após este período esta solução foi descartada e foi adicionado 2ml de H₂O MilliQ® as amostras mantidas sob agitação a 37° C por 15 segundos. Em seguida, a H₂O MilliQ® foi descartada e adicionado 2 ml de tampão TE (1995,4 µl) + PMSF (4,6µl) e incubado por 30 minutos a 37° C sob agitação. A lavagem com TE-PMSF foi repetida por 2 vezes. Em seguida solução TE-PMSF foi descartada e foi adicionado 2 ml H₂O MilliQ® e incubado por 15 minutos a 37° C sob agitação.

Após o processo de lise os blocos foram lavados uma vez com H₂O MilliQ® e três vezes com tampão de eluição, sendo cada lavagem de 30 minutos a 37° C sob agitação. Os blocos foram mantidos a 4° C em microtubos com 900 µl de tampão TE até o momento do corte com a enzima de restrição.

Restrição do DNA genômico

Uma fração dos blocos de agarose contendo a amostra foi submetida ao processo de pré-restrição adicionando aos *plugs* 225µl de H₂O MilliQ® e 25µl de tampão de enzima e incubando durante 1 hora em temperatura ambiente. Após este período a solução de pré-restrição foi descartada e foi adicionado aos *plugs* 50µl do mix de restrição (5µl de tampão da enzima, 2µl da enzima de restrição *Xba* I (Amershan biosciences) e 43 µl de H₂O MilliQ® e incubado a 37° C por 24h.

Eletroforese

As amostras foram submetidas ao perfil de macrorestrição através de ensaios de PFGE utilizando o sistema de eletroforese CHEF DR III Chiller System (Bio-Rad).

Os blocos contendo as amostras bacterianas foram colocados em gel de agarose 1% (FMC BioProducts), e a corrida foi conduzida em dois períodos, um período de 11 horas a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 7,0 segundos e final de 12 segundos e outro período de 13 horas a 6V/cm, ângulo fixo de 120°, com pulso inicial de 20 segundos e final de 40 segundos, em tampão TBE 0,5X (Tris-borato-EDTA 50 mM Tris, 45 mM Borato, 0,5 mM EDTA [pH 8.4]) mantido a 14°C.

O gel foi corado por 1h em uma solução de brometo de etídio (5 mg/mL) e a visualização dos fragmentos foi realizada sob iluminação ultra-violeta em sistema de foto documentação ImageMaster® (Amershan Biosciences). Os fragmentos foram identificados com base na utilização de um marcador de alto peso molecular λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences).

4.2.6 Determinação do Índice Discriminatório (ID)

O índice discriminatório é a capacidade de discriminar cepas altamente similares, neste estudo os resultados obtidos através da caracterização genotípica pelo AFLP e pelo PFGE foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), com a seguinte fórmula:

$$DI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j-1)$$

Onde N é o número de amostras da população em estudo, s é o número de diferentes tipos e n_j é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população serem alojados em diferentes grupos.

4.2.7 Análise estatística dos fragmentos amplificados

Para análise estatística dos fragmentos amplificados foi utilizado o programa NTSYS ("Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System"). A similaridade das amostras foi estimada através do coeficiente de Jaccard, representado pela seguinte fórmula:

Jaccard: $S_j = (a/n-d)$

Onde a, b, c e d são possíveis de serem visualizados quanto ao seu significado na forma de uma tabela de frequência para os dois objetos α e β :

		α	
		+	-
β	+	a	b
	-	c	d

Sendo que, $n=u+m$ é o número total de bandas, $m=a+d$ é o número de bandas compartilhadas e $u=b+c$ é o número de bandas não compartilhadas.

Com a matriz de similaridade gerada pelo coeficiente de Jaccard foi possível determinar os grupos pelo Método de Associação Média (UPMGA- Unweighthed Pair-Group Method Using Arithmetic Average), que foi representado pela forma de dendrograma.

5 RESULTADOS

Bacteriológico e Sorotipagem

Dentre os 50 suínos apresentando sinais de enterite ou septicemia examinados no Laboratório de Sanidade Suína –VPS- FMVZ-USP, 38% dos animais oriundos de 12 granjas foram positivos para o isolamento de *Salmonella* spp.

Foram avaliadas amostras de fezes, linfonodos mesentéricos, pulmão e líquido de cavidades abdominal e torácica. O número de animais positivos por granja, e o número de cepas selecionadas de cada animal é descrito na tabela 1.

Tabela 1 - Número de animais positivos e origem dos isolados selecionados em animais com suspeita de salmonelose-São Paulo- 2008

Granja	Estado	Caso	Suínos positivos	Origem e nº das cepas selecionadas				
				F	LM	P	Cav	Total cepas
E	SP	CC1/2	2	0	0	4	5	9
F	RS	CC 3 / 4	2	2	0	0	0	2
G	SP	CC 5 / 6	2	0	2	0	0	2
H	SP	CC 7	1	0	0	1	0	1
I	SP	CC 8	1	3	0	0	0	3
J	SP	CC 9	1	3	0	0	0	3
K	RS	CC 10 / 11	2	2	0	0	0	2
L	SP	CC 12	1	3	0	0	0	3
M	PR	CC 13	1	2	0	0	0	2
N	SP	CC 14 / 15	2	6	0	0	0	6
O	SP	CC 16 /17	2	6	0	0	0	6
P	SP	CC18 /19	2	0	3	3	0	6
Total			19	27	5	8	5	45

* CC- caso clínico, F- fezes, LM- linfonodo mesentérico, P- Pulmão, Cav- cavidades

Foram confirmados como *Salmonella* spp. 45 isolados que foram classificados por meio da sorotipificação em: *S. Typhimurium* (29/45), *S. Choleraesuis* (9/45), *S. Infantis* (3/45) e *S. enterica* subsp. *enterica* (4/45) (Tabela 2).

Tabela 2 – Sorovares de *Salmonella* spp. isolados nos animais com quadro clínico de salmonelose segundo o sítio de isolamento-São Paulo- 2008

Sorovares	Origem e nº das cepas caracterizadas				Total cepas
	Fezes	Linfonodo mesentérico	Pulmão	Cavidades	
<i>S. Choleraesuis</i>	0	0	4	5	9
<i>S. Typhimurium</i>	25	3	1	0	29
<i>S. Infantis</i>	0	0	3	0	3
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	2	2	0	0	4

Dentre os 124 suínos sadios provenientes de quatro abatedouros submetidos à pesquisa de *Salmonella* spp. foram identificados 20 animais positivos para o agente (16,12%). Dez animais foram positivos em amostras de fezes, oito foram positivos em amostras de linfonodos, um suíno foi positivo em carcaça e apenas um animal foi positivo simultaneamente para linfonodo e fezes (Tabela 3).

No frigorífico A, foram selecionadas 19 colônias de *Salmonella* spp. de 10 animais, sendo 11 isolados identificados através da sorotipagem como *S. Anatum*, quatro como *S. Typhimurium*, dois como *S. Agona*, um como *S. enterica* subsp. *enterica* cepa rugosa e um como *S. enterica* subsp. *enterica* (04,5).

No frigorífico B foram isoladas 14 colônias de *Salmonella* spp de sete animais, sendo 11 isolados identificados como *S. London*, dois como *S. Enteritidis* e um como *S. Typhimurium*.

No frigorífico C, não foram isoladas colônias sugestivas de *Salmonella* spp. No frigorífico D, foram selecionadas seis colônias de *Salmonella* spp de três animais, das quais três foram classificadas como *S. Typhimurium* e três como *S. enterica* subsp. *enterica* (04,5:1.2), estes dados são resumidos nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Número de animais positivos de acordo com os materiais examinados nosfrigoríficos visitados e número de cepas selecionadas para caracterização- São Paulo- 2008

Frigoríficos	Positivo/ total	Fezes		Linfonodos		Carcaça		Total cepas
		Amostra positiva	Nº cepas	Amostra positiva	Nº cepas	Amostra positiva	Nº cepas	
A	10/31	4/31	8	5/31	10	1/31	1	19
B	7/31	4/31	8	3/31	6	0/31	0	14
C	0/31	0/31	0	0/31	0	0/31	0	0
D	3/31	3/31	6	0/31	0	0/31	0	6
Total	20/124	11/124	22	8/124	16	1/124	1	39

Tabela 4 – Sorovares das cepas de *Salmonella* spp. isoladas em suínos ao abate segundo o sítio de isolamento-São Paulo- 2008

Sorovares	Frigoríficos									Total
	A			B			D			
	F*	L*	S*	F*	L*	S*	F*	L*	S*	
S. London	0	0	0	7	4	0	0	0	0	11
S. Typhimurium	0	3	1	1	0	0	3	0	0	8
S. Anatum	5	6	0	0	0	0	0	0	0	11
S. Agona	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
S. Enteritidis	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1	1	0	0	0	0	3	0	0	5
Total	8	10	1	8	6	0	6	0	0	39

*F- fezes, L - linfonodo mesentérico e S - suabe de carcaça

Caracterização Genotípica

Com o objetivo de caracterizar e discriminar os isolados foram empregadas às técnicas do AFLP e PFGE. Os padrões de restrição obtidos foram analisados visualmente, sendo considerados diferentes os isolados que apresentaram um fragmento de restrição distinto. A similaridade entre os padrões foi calculada através do coeficiente de Jaccard e agrupados usando o UPMGA. O poder de discriminação

das técnicas do AFLP e PFGE foi determinado pelo Índice Discriminatório descrito por Hunter e Gaston (1998).

O valor ID indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso na população estudada serem classificados em grupos diferentes.

O AFLP foi realizado utilizando-se a enzima de restrição *Hind* III, a escolha da enzima foi realizada com base em estudos realizados por Sood et al. (2002).

A análise das 84 amostras submetidas (45 cepas isoladas de casos clínicos e 39 cepas de animais aparentemente sadios em frigoríficos) à técnica do AFLP revelou a presença de 12 perfis distintos que foram designados A a L, cada perfil gerou entre 4 a 11 fragmentos (bandas) de DNA entre aproximadamente 400-3000 pb. Os perfis encontrados foram diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda, e todos eles apresentaram uma banda medindo aproximadamente 3000 pb. O AFLP apresentou índice discriminatório igual a 0,85. Exemplos de perfis obtidos são apresentados nas figuras 3 e 4.

O dendrograma criado a partir de isolados de casos clínicos (Figura 5), apresenta nove perfis (A, B, C, G, H, F, E, J e K), pode-se observar nesta figura dois agrupamentos denominados I e II, com coeficiente de similaridade de 35%. No agrupamento I, encontra-se 44 das amostras estudadas, e no agrupamento II, apenas a amostra 10 pertencente ao sorovar *Choleraesuis*.

No agrupamento I observam-se dois grupos principais, o Ia e Ib, com 50% de similaridade. O grupo Ia com 38 isolados pode ser dividido em Ic e Id. O subgrupo Ic apresenta 12 cepas e concentra as amostras de *S. Choleraesuis*, *S. Infantis* e uma *S. enterica* subsp *enterica* 04,5 provenientes de quatro suínos originados de duas granjas. O subgrupo Id é formado principalmente por *S. Typhimurium*, contendo apenas duas cepas de *S. enterica* subsp *enterica* 04,5 com similaridade 70%.

O grupo Ib reúne seis amostras analisadas com coeficiente de similaridade de 100% classificadas como *S. Typhimurium* e uma *S. enterica* subsp *enterica* 04,5.

A partir do dendrograma gerado com os isolados de frigorífico (Figura 6), foram obtidos cinco perfis distintos (D, F, E, I e L), no qual foi possível observar dois agrupamentos denominados III e IV, com coeficiente de similaridade inferior a 25%. No agrupamento III estão incluídas 97,4% das amostras, sendo dividido em dois grupos IIIa e IIIb com cerca de 65% de similaridade. O grupo IIIb é formado por dois isolados de *S. enterica* subsp *enterica* 04,5: 1,2 provenientes de um mesmo animal do frigorífico D.

O grupo IIIa com similaridade superior a 75%, pode ser subdividido em três subgrupos, o IIIc que agrupa com 100% de similaridade entre si 23 amostras dos frigoríficos A e B e de quatro sorovares distintos (*S. Agona*, *S. Anatum*, *S. London* e *S. Enteritidis*). O subgrupo IIId onde estão agrupadas seis amostras de *S. Typhimurium*, uma de *S. London* e duas *S. enterica* subsp *enterica* 04,5 e 04,5:_:1,2. O subgrupo IIle é formado de um isolado de *S. Typhimurium* e dois de *S. London*. O agrupamento IV abriga apenas uma amostra de *S. enterica* subsp *enterica* rugosa.

Observando o dendrograma que reúne todos os isolados de casos clínicos e frigoríficos tipificados pelo AFLP, encontram-se dois agrupamentos distintos V e VI com coeficiente de similaridade superior a 45% (Figura 7).

No agrupamento V, foram reunidos 82 dos 84 isolados com coeficiente de similaridade próximo de 73%. Este agrupamento pode ser subdividido em dois grupos Va e Vb. O grupo Vb apresenta seis isolados de casos clínicos classificados como *S. Typhimurium* e um *S. enterica* subsp *enterica* 04,5. O grupo Va é bastante complexo, podendo ser subdividido em Ve e Vf. O subgrupo Ve apresenta 12 amostras de casos clínicos, classificadas como *S. Choleraesuis*, *S. Infantis* e uma cepa de *S. enterica* subsp *enterica* 04,5, estes isolados são provenientes de quatro suínos provenientes de duas granjas. O subgrupo Vf reúne 62 amostras com cerca de 80% de similaridade entre si, neste subgrupo encontram-se as cepas pertencentes ao perfil D, isolados de *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. London* e *S. Enteritidis* provenientes dos frigoríficos A e B. Esta presente neste subgrupo a maior parte dos isolados de *S. Typhimurium* distribuídas nos perfis C, E, F, G e H.

O agrupamento VI abriga os dois isolados com baixa similaridade em relação ao resto do grupo, a amostra 10 e 62 de *S. Choleraesuis* e *S. enterica* subsp *enterica* rugosa respectivamente.

Neste dendrograma pode-se observar que amostras de *S. Typhimurium* isoladas de animais com lesões e suspeita de enterocolite se misturam com os isolados de animais portadores examinados nos abatedouros (perfis E e F). Amostras de casos de septicemia foram discriminadas em subgrupos mais isolados.

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. 2 a 16 - Exemplo dos perfis obtidos através do AFLP em amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos. 1 e 17-Marcador de pares de base 100bp DNA Ladder (LGC)

Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%. 2 e 21 - Exemplo dos perfis obtidos através do AFLP em amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos. 1 e 22-Marcador de pares de base 100bp DNA Ladder (LGC)

Figura 5 - Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica do AFLP com amostras de *Salmonella* spp isoladas de casos clínicos.

Figura 6- Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica do AFLP com amostras de *Salmonella* spp isoladas de suínos ao abate

Figura 7 - Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamento do coeficiente de Jaccard pela técnica de AFLP com amostras de *Salmonella* spp isoladas casos clínicos e suínos ao abate

Dos 84 isolados de *Salmonella* spp., quatro amostras não foram analisadas pela técnica de PFGE, pois não apresentaram crescimento em meio de cultura. Das 80 amostras estudadas, duas não foram tipificadas sendo levantadas às possibilidades de degradação da molécula de DNA purificado ou a presença de inibidores da reação de clivagem do DNA impedindo a ação da enzima de restrição.

O PFGE foi realizado utilizando-se a enzima de restrição *Xba* I, a escolha da enzima foi realizada com base em estudos realizados por (LIU; SANDERSON, 1992; SOOD et al., 2002) que obtiveram bons resultados na tipificação de *Salmonella* spp.

Ao serem classificados pela técnica de PFGE, os 78 isolados apresentaram 31 padrões de macro-restrição, apresentando de 10 a 17 bandas, com tamanhos de aproximadamente 220 a 1100 kb. O índice discriminatório obtido a partir do PFGE foi de 0,96. Exemplos dos padrões de macro-restrição obtidos estão apresentados nas figuras 8 e 9. Os perfis encontrados foram diferentes entre si pela presença ou ausência de pelo menos uma banda, e não foi encontrada nenhuma banda comum a todos os perfis.

A partir do dendrograma gerado com os isolados de casos clínicos observamos 18 perfis distintos, no qual observamos dois agrupamentos distintos I e II, com coeficiente de similaridade de 40% (Figura 10). O agrupamento I é composto por quatro amostras com 57% de similaridade.

O agrupamento II é mais complexo e reúne 35 amostras com similaridade de 50%, é composto pelos grupos IIa e IIb. O grupo IIb reúne cepas de *S. Choleraesuis*, *S. Infantis* e *S. Typhimurium*, com similaridade de 58%.

O grupo IIa é formado de 23 amostras de *S. Typhimurium* e 3 amostras de *S. enterica* subsp. *enterica* 04,5 isoladas de fezes e linfonodos com similaridade de 55%, este grupo subdivide-se em 2 subgrupos, o IIc que reúne amostras de *S. Typhimurium* e *S. enterica* subsp. *enterica* isoladas de fezes e o IIId formado de amostras de *S. Typhimurium* e *S. enterica* subsp. *enterica* isoladas de linfonodos, pulmão e fezes.

No dendrograma criado a partir dos isolados de frigorífico, gerou-se 14 perfis distintos (Figura 11). Podem ser observados dois agrupamentos denominados III e IV com coeficiente de similaridade de 25%. No agrupamento III, encontram-se 37 amostras e no agrupamento IV apenas duas pertencentes ao sorovar Agona.

No agrupamento III tem-se dois grupos principais, o IIIa e IIIb, com 35% de similaridade. O grupo IIIb com 23 amostras e pode ser dividido em IIIc, IIId e IIIE. O subgrupo IIIc apresenta 2 cepas de *S. enterica* subsp. *enterica* 04,5, provenientes do mesmo animal com 100% de similaridade. O subgrupo IIId apresenta 46% de similaridade, sendo composto por isolados de *S. Anatum* com 95% de similaridade; *S. Typhimurium*, *S. enterica* subsp. *enterica* 04,5 e *S. enterica* subsp. *enterica* 04,5:_:1.2 com 70% de similaridade.

O subgrupo IIIE é composto de amostras de *S. Anatum* e *S. enterica* subsp. *enterica* rugosa com 45% de similaridade.

O grupo IIIa, reúne amostras com 40% de similaridade, sendo formado de dois agrupamentos, o IIIf formado por amostras de *S. London* e *S. Enteritidis*, provenientes de animais do frigorífico B e o IIIg com amostra de *S. London*.

Analisando o dendrograma que reúne todos os isolados de casos clínicos e frigoríficos, observa-se dois agrupamentos distintos V e VI com coeficiente de similaridade inferior a 25% (Figura 12). No agrupamento V, observamos 76 dos 78 isolados tipificados através do PFGE com aproximadamente 35% de similaridade.

O agrupamento V é formado de dois grupos, o Va e Vb com similaridade de 35%. O grupo Va reúne isolados de frigoríficos dos sorotipos London e Enteritidis e apresenta 60% de similaridade, o Vb é composto por isolados de frigorífico e caso-clínico com similaridade de 40%. Este grupo é formado dos subgrupos Vc, Vd e Vf. O subgrupo Vc é composto de isolados de *S. Anatum* e *S. enterica* subsp. *enterica* provenientes dos frigoríficos; o subgrupo Vd é formado por isolados de frigorífico e caso clínico com 50% de similaridade, neste grupo observa-se uma diversidade em padrões de PFGE, no entanto preserva-se a divisão dos padrões de PFGE de acordo com os sorotipos. Neste subgrupo observa-se que o perfil VI é composto de *S. Typhimurium* isoladas de casos clínicos e de animais sadios.

Figura 8 - Eletroforese em gel de campo pulsado. 2 a 14 - Exemplo dos perfis obtidos através do PFGE em amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos. 1 e 15 - Marcador de pares de base λ DNA-PFGE (Amershan Biosciences). 14 - *S. Typhimurium* LT2-controle positivo

Figura 9 - Eletroforese em gel de campo pulsado. 2 a 14- Exemplo dos perfis obtidos através do PFGE em amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suínos. 1 e 15 - Marcador de pares de base λ DNA- PFGE (Amershan Biosciences). 14 - *S. Typhimurium* LT2-controle positivo

Figura 10- Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado das amostras de *Salmonella* spp. isoladas de casos clínicos.

Figura 11-Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado das amostras de *Salmonella* spp. isoladas de frigorífico.

Figura 12- Dendrograma baseado em UPMGA a partir da análise de agrupamentos do coeficiente de Jaccard pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado das amostras de *Salmonella* spp. isoladas de frigorífico e casos de clínicos.

6 DISCUSSÃO

A salmonelose em suínos é causada principalmente por *S.Typhimurium* e *S. Choleraesuis* associados aos quadros entéricos e septicêmicos, respectivamente (SCHWARTZ, 2000).

A doença afeta animais desmamados até a fase de terminação, raramente afetando leitões lactentes, devido ao colostro que teria um papel de proteção significativo (SILVA et al., 2003).

Nos suínos poucos sorotipos estão associados ao quadro clínico da doença, entretanto, os sorotipos não patogênicos são os principais envolvidos na contaminação da carne (WEGNER; BAGER, 1997).

No Brasil, existem inúmeros relatos do isolamento de *Salmonella* spp. em suínos sadios (LAZARO et al., 1997). No entanto, existem poucos estudos sobre a importância do agente em suínos apresentando sinais clínicos da doença.

O presente estudo propôs o isolamento de *Salmonella* spp. em suínos sadios no momento do abate, em suínos com sinais clínicos sugestivos de salmonelose, sorotipagem dos isolados e caracterização genotípica através do AFLP e PFGE.

No estudo da ocorrência de *Salmonella* spp. em animais com suspeita de salmonelose, o agente foi isolado em 38% dos 50 animais estudados. Nestes casos foram identificados os seguintes sorovares: *S.Typhimurium* (64,4%), *S. Choleraesuis* (20%), *S.Infantis* (6,7%) e *S. enterica* subsp. *enterica* 04,5 (8,9%).

Nas amostras isoladas de fezes e linfonodos, associadas ao quadro de enterocolite houve predomínio do sorovar Typhimurium, assim como isolados classificados como *S. enterica* subsp. *enterica* 04,5.

Em dois animais provenientes da mesma propriedade foi isolado *S. Infantis* a partir do pulmão, sendo que um destes animais apresentou *S.Typhimurium* e o outro *S. enterica* subsp. *enterica* 04,5, ambos em linfonodos mesentéricos.

Bessa et al. (2004) descreveram a ocorrência de *S. Infantis* em animais examinados ao abate, no entanto, não foram encontrados relatos deste sorovar em pulmão de suínos com salmonelose.

Nas amostras clínicas de pulmão, cavidades torácica e abdominal foi observado o predomínio do sorovar *Choleraesuis*, achado que esta de acordo com

as características septicêmicas deste sorovar. Em alguns países a *S. Choleraesuis* é o sorovar mais freqüente em animais de engorda com quadro de salmonelose.

O único relato deste sorovar no país foi realizado por Barcellos et al. (1991), que descreve a ocorrência de septicemia por *S. Choleraesuis* em leitões lactentes no RS, apesar da baixa ocorrência deste sorovar nesta faixa etária devido à imunidade passiva.

Dentre os animais examinados ao abate 16,12% (20/124) foram positivos através do isolamento, sendo esta freqüência inferior aos achados por Bessa et al. (2004) e Castagna et al. (2004) que observaram em abatedouros da região sul do país, respectivamente 83% e 56% dos suínos em idade de abate carreando *Salmonella* spp. Supõe-se que a ocorrência de *Salmonella* spp. esteja associada a múltiplos fatores que influenciam diretamente a intensidade de contaminação do lote, sendo estes fatores relacionados ao sistema de produção, ao status sanitário do plantel, ao transporte e ao próprio frigorífico.

O transporte, o tempo de espera nas baias do abatedouro e a superlotação nestes dois momentos têm sido descritos como fatores com influência direta sobre o aumento no isolamento de *Salmonella* em frigoríficos (MORROW et al., 2000). Fatores estressantes ligados a esta fase induzem ao aumento na excreção de *Salmonella* spp. presente no conteúdo intestinal e linfonodos mesentéricos de animais portadores, tornando-os fonte de infecção para outros que estejam alojados na mesma baia (WILLIAMS; NEWELL, 1970).

Dentre os quatro frigoríficos avaliados neste estudo, dois deles abatiam em média 400 suínos por dia (A e D) e os outros dois aproximadamente 200 suínos por semana (B e C). Apenas o frigorífico A apresentava um tempo de espera dos animais para o abate superior a seis horas, os outros abatiam os suínos poucos minutos após o desembarque. Os animais abatidos eram provenientes de granjas do Estado de São Paulo e haviam percorrido distâncias relativamente curtas durante o transporte. Estes fatores provavelmente influenciaram na baixa ocorrência do agente observada neste estudo.

Os isolados obtidos em animais sadios foram classificados como *S. London* (28,2%), *S. Anatum* (28,2%), *S. Typhimurium* (20,5%), *S. Agona* (5,1%), *S. Enteritidis* (5,1%) e *S. enterica* subsp. *enterica* (12,9%). Correlacionando os resultados apresentados neste trabalho com estudos anteriores realizados principalmente no sul do Brasil, observa-se nestes últimos maior freqüência de

animais positivos e maior variedade de sorovares descritos. No entanto, é consenso que os sorovares Agona, Typhimurium, London, Anatum, Enteritidis são bastante freqüentes no Brasil e no mundo (NEIVA, 1946; WEISS et al., 2002).

Apenas um animal foi positivo para *Salmonella* em fezes e linfonodo simultaneamente, sendo identificados os sorovares London em fezes e Enteritidis em linfonodo. Este achado está de acordo com os resultados obtidos por Castagna et al. (2004) que observaram na maioria dos casos examinados, isolados de linfonodos e fezes pertencentes à sorovares diferentes. Blaha (1998) também descreve mais de um sorovar isolado em um mesmo animal, demonstrando a possibilidade de infecção múltipla em um mesmo grupo de animais.

Estudos apontam uma ampla variedade de sorotipos de *Salmonella* isolados nas propriedades de criação de suínos, indicando que existem diversas fontes de introdução do agente nas propriedades. Dentre estas fontes, a ração tem sido apontada como uma importante forma de entrada do microrganismo nas propriedades produtoras de suínos e um dos maiores fatores de risco de contaminação dos plantéis (FIALHO et al., 1985; TIELEN et al., 1997).

Albuquerque et al. (1999), em estudos da ocorrência de salmonelas em ingredientes de rações, observaram a presença do agente em 27/136 amostras estudadas (19,85%), sendo a freqüência de positividade de 50% para matérias-primas de origem animal, 12,5% para derivados vegetais e industriais e 7,5% derivados lácteos. Os sorovares encontrados foram *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Montevideo*, *S. Mbandaka*, *S. Emek*, *S. Newlands*, *S. Anatum*, *S. Moloka*, *S. Muenster*, *S. Senftenberg* e *S. Cerro*, sendo que a maior ocorrência foi de *S. Anatum* (9/25).

Surtos de doenças infecciosas em humanos e animais geralmente estão associadas a uma fonte comum de infecção. Normalmente, o agente responsável pela doença é derivado de célula única, cuja progênie é geneticamente idêntica ou semelhante ao original. Em termos epidemiológicos, os agentes envolvidos em surtos de doenças possuem uma relação clonal, o que significa que são membros da mesma espécie e compartilham fatores de virulência, características bioquímicas e genotípicas. No entanto, dentro desta mesma espécie existe diversidade genética o suficiente para que organismos isolados de diferentes origens, regiões geográficas, sejam diferenciados e classificados em subespécies, linhagens e tipos (OLIVE; BEAN, 1999).

Tradicionalmente, as bactérias são classificadas de acordo com suas características de crescimento, morfologia e características bioquímicas. Entretanto uma maior discriminação é obtida através de metodologias de tipagem como a sorotipagem, fagotipagem e métodos baseados na análise de DNA. A sorotipagem é a metodologia tradicional para tipificação de *Salmonella* spp., sendo baseada na estrutura química de flagelos e lipopolissacarídeos (POPOFF; MINOR, 1997). No entanto para muitos estudos, esta metodologia não é suficientemente discriminativa, sendo necessário o uso de técnicas de tipagem molecular.

Os métodos de tipagem possuem alta capacidade de diferenciação, sendo capaz de diferenciar cepas não relacionadas, como aquelas que são geograficamente distintas do organismo de origem, e ao mesmo tempo demonstrar a relação de organismos isolados de um indivíduo com a fonte de infecção. Diversas técnicas moleculares tem sido utilizadas na tipagem de amostras bacterianas, sendo a escolha da metodologia a ser utilizada dependente de diversos fatores relacionadas à características intrínsecas ao método como poder discriminatório, reprodutibilidade, custo (OLIVE; BEAN, 1999).

Para diferenciação de amostras da mesma espécie, no presente estudo optou-se por técnicas que utilizam restrição enzimática do DNA genômico bacteriano, como é o caso do AFLP e PFGE.

A técnica de AFLP apresenta duas variações básicas, podendo ser realizada utilizando-se duas enzimas de restrição ou apenas uma enzima. A versão utilizando duas enzimas é descrita na literatura para caracterização de *Salmonella* spp., no entanto a utilização desta técnica é limitada pela dificuldade em comparar perfis complexos que consistem de centenas de bandas de DNA que podem estar sobrepostas (AARTS et al., 1998).

No presente estudo objetivou-se testar a aplicação da metodologia que utiliza apenas uma enzima de restrição na caracterização dos isolados, uma vez que esta apresenta menor custo de execução, maior rapidez, boa reprodutibilidade, sendo que desta forma os resultados podem ser analisados visualmente após a eletroforese em gel de agarose, sem a necessidade de equipamentos sofisticados.

O AFLP com apenas uma enzima de restrição tem sido descrito por diversos autores para diferenciação de agentes como *Legionella pneumophila* (VALSAGIACOMO et al., 1995), *Helicobacter pylori* (GIBSON et al., 1998), *Chlamydia psittaci* (BOUMEDINE; RODOLAKIS, 1998), *Clostridium perfringens*

(MCLAUCHLIN et al., 2000), *Salmonella* Typhimurium (SOOD et al., 2002), *Salmonella* Enteritidis (VAZ, et al., 2007)

A partir da análise das amostras obtidas pela técnica do AFLP, obtiveram-se os dendrogramas das figuras 5, 6 e 7. O índice discriminatório apresentado pela técnica foi de 0,85.

No dendrograma da figura 5 que apresenta as amostras de casos clínicos, pode-se observar que a técnica apresenta uma boa discriminação dos isolados e sua separação em grupos bastante delimitados segundo o sorovar, órgão de isolamento e propriedade de origem. No dendrograma da figura 6, que apresenta as cepas isoladas em abatedouro, observa-se total similaridade entre os isolados classificados como *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. London* e *S. Enteritidis*, mostrando que o AFLP não foi capaz de diferenciar estas cepas, apesar de discriminar este grupo das cepas de *S. Typhimurium* e *S. enterica* subsp. *entérica* (04,5 e 04,5:1.2). O dendrograma apresentado na figura 7, que reúne os isolados de quadro clínico e abatedouro, indica que houve uma boa discriminação entre os isolados de casos clínicos e frigoríficos e mantém a separação de alguns sorovares como *S. Choleraesuis* em grupos com menor similaridade.

Streck et al. (2007) estudaram a técnica de AFLP com a enzima *Hind* III em amostras de *Salmonella* Enteritidis de origem suína e humana e obtiveram índice discriminatório de 0,28. Em relação ao padrão de restrição, foram encontrados perfis que variaram de quatro a onze fragmentos situando-se entre 400 a 3000 pb, semelhantes ao encontrado neste estudo. A capacidade discriminativa inferior do AFLP obtida por estes pesquisadores pode ser devido ao fato de estarem estudando apenas um sorotipo.

A partir da análise de macrorestrição foram obtidos 31 perfis, estes resultados sugerem que a análise por PFGE apresentou maior poder de discriminação que o AFLP, o que também é evidenciado pelo índice discriminatório que foi de 0,96.

Analisando o dendrograma gerado a partir do PFGE das amostras isoladas de caso clínico, observa-se que cepas de *S. Typhimurium* que apresentaram o mesmo perfil com total similaridade no AFLP (perfis E, F, G e J), no PFGE foram classificadas em perfis diferentes com menor similaridade.

Nos isolados de *S. Choleraesuis* e *S. Infantis* os resultados obtidos no AFLP (perfis A e B) foram semelhantes ao do PFGE (perfis I e II) indicando que houve pouca variação genética nas cepas estudadas destes sorovares.

No dendrograma gerado pelo PFGE a partir dos isolados de frigorífico, observamos que os sorovares Anatum, Agona e London que no AFLP apresentaram o mesmo perfil de restrição com 100% de similaridade (perfil D), no PFGE foram classificados em perfis diferentes reunidos em grupos com 35% de similaridade (perfis XXIV, XXV, XXVI, XXXIX, XXX e XXXI).

No dendrograma a partir dos isolados de caso-clínico e frigorífico, observa-se que houve o agrupamento das amostras de acordo com o sorotipo e origem dos isolados (caso-clínico ou frigorífico), em apenas um agrupamento amostras de caso-clínico e frigoríficos apresentaram o mesmo perfil (perfil VI).

Gebreyes et al. (2006) em estudos da aplicação do PFGE com a enzima *XbaI* em isolados de *Salmonella* Typhimurium de origem suína obtiveram ID de 0.925.

Gaul et al. (2007), descrevem a aplicação da PFGE para caracterização de isolados de *Salmonella* provenientes de suínos e classificadas em diferentes sorotipos com índice discriminatório de 0.8. Estes autores verificaram que apesar do alto poder de discriminação e capacidade de identificar diferenças entre cepas de um mesmo sorovar a PFGE agrupa os isolados em subgrupos criando alguns padrões semelhantes entre os sorotipos. Esta tendência de agrupar as cepas de acordo com os sorotipos foi observada tanto no AFLP como no PFGE, sendo mais precisa no PFGE.

No presente estudo as técnicas do AFLP e PFGE apresentaram elevado poder discriminatório, reprodutibilidade e concordância nos resultados, sugerindo potencial para sua aplicação em estudos epidemiológicos de *Salmonella* spp..

7 CONCLUSÕES

- O sorotipo Choleraesuis ocorre em suínos com septicemia em sistemas intensivos de produção no Brasil.
- O sorotipo Typhimurium foi o de maior ocorrência entre os animais estudados.
- O poder discriminatório dos métodos baseados em análise de DNA é maior que os procedimentos fenotípicos.
- O AFLP utilizando uma enzima *Hind* III apresentou reprodutibilidade, poder discriminatório, facilidade na execução e baixo custo.
- A técnica de AFLP com uma enzima de restrição pode ser aplicada a caracterização de *salmonella* spp.
- O PFGE utilizando a enzima *Xba* I apresentou reprodutibilidade e poder discriminatório.
- Os grupos formados através da técnica de PFGE apresentaram correlação com a sorotipagem.
- Os resultados obtidos através das técnicas de AFLP e PFGE apresentaram boa concordância, sugerindo grande potencial para sua aplicação na genotipagem de *Salmonella* spp.

REFERÊNCIAS

- ARTS, H. J. M.; VAN LITH, L. A. J. T.; KEIJER, J. High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 131-135, 1998.
- ALBUQUERQUE, R.; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Estudo da ocorrência de salmonelas em ingredientes, rações e suabes de pó colhidos em uma fábrica industrial de ração. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 6, p. 1-4, 1999.
- BARCELLOS, D. E. S. N.; RODRIGUES, N. C.; OLIVEIRA, S. J.; BOROWSKI, S. M. Ocorrência de salmonelose septicêmica em suínos no período neonatal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 19, p. 41-44, 1991.
- BERENDS, B. R.; URLINGS, H. A. P.; SNIJDERS, J. M. A.; VAN KNAPEN, F. Identification and quantification of risk factors in animal management and transport regarding *Salmonella* spp. in pigs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, p. 37-53, 1996.
- BESSA, M. C.; COSTA, M.; CARDOSO, M. Prevalência de *Salmonella* sp. em suínos abatidos em frigoríficos do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 80-84, 2004.
- BLAHA, T. Pre-harvest food safety and *Salmonella* reduction in the pork chain. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre, **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2001. v. 1, p. 39-42.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria Nacional de Vigilância sanitária de alimentos – DINAL. Padrões microbiológicos para produtos expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo. Portaria n. 451 de 19 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União**, Brasília, 22 de setembro de 1997. Seção 1, p. 21005-21012.
- BRENNER, F. W.; VILLAR, R. G.; ÂNGULO, F. J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

BOOM, R.; SOL, C. J.; SALIMANS, M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M.; VAN DER NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BOUMEDINE, K.; RODOLAKIS, A. AFLP allows the identification of genomic markers of ruminant *Chlamydia psittaci* strains useful for typing and epidemiological studies. **Research in Microbiology**, v. 149, p. 735-744, 1998.

CARDOSO, M. Doenças transmitidas por alimento de origem suína. In: SIMPÓSIO UFRG SOBRE MANEJO, REPRODUÇÃO E SANIDADE SUÍNA, 1., 2006, Porto Alegre. p. 92-111.

CASTANHA, S. M. F.; SCHWARZ, P.; CANAL, C. W.; CARDOSO, M. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 2, p. 141-147, 2004.

CDC-Centers for Diseases control and Protection. 2008. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salmonellosis_g.htm. Acesso em: 20 Abril. 2008.

CLARKE, R. C.; GYLES, C. L. Salmonella. In: GYLES, C. L.; CHARLES, O. T. **Pathology bacterial infection animal**. 2. ed. Ames: Iowa State University, 1993, p.133-153.

CROSA, J. H.; BRENNER, D. J.; EWING, W. H.; FALKOW, S. Molecular relationships among the *Salmonelleae*. **Journal of Bacteriology**, v. 115, n. 1, p. 307-315, 1973.

D'AOUST, J.Y.; SEWELL, A.; JEAN, A. Limited sensitivity of short (6h) selective enrichment for detection of foodborne Salmonella. **Journal of Food Protection**, v. 53, n. 7, p. 562-565, 1990.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella* and the international food trade. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 24, p. 11-31, 1994.

D'AOUST, J. Y. *Salmonella* species In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. **Journal food microbiology**. Washington, ASM Press, 1997, p. 129-158.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular basis of interaction of salmonella with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Review**, v. 12, p. 405-428, 1999.

DESAI, M.; TANNA, A.; WALL, R.; EFSTRATIOU, A.; GEORGE, R.; STANLEY, J. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism analysis of an outbreak of group A streptococcal invasive disease. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3133-3137, 1998.

DUIM, B.; WASSENAAR, T. M.; RIGTER, A.; WAGENAAR, J. A. High-resolution genotyping of *Campilobacter* strains isolated from poultry and humans with AFLP fingerprinting. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2369-2375, 1999.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 1091-1101, 1996.

FEDORKA-CRAY, P. J.; WHIPP, S. C.; ISAACSON, R. E.; NORD, N.; LAGER, K. Transmission of *Salmonella* typhimurium to swine. **Veterinary Microbiology**, v.41, p. 333-344, 1994.

FEDORKA-CRAY, P. J. The connection between *Salmonella* swine and food safety. In: SWINE CONFERENCE, 1996, Nebraska. **Anais...** Nebraska: Lincoln, 1996. p. 25-45.

FEDORKA-CRAY, P. J.; HOGG, A.; GRAY, J.T.; LORENZEN, K.; VELASQUEA, J.; VON BEHREN, P. Feed and feed trucks as sources of *Salmonella* contamination in swine. **Swine Health Production**, v.5, p.189-193, 1997.

FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C. R.; DIAS, A. M. G.; ALMEIDA, I. A. Z. C.; MELO, L. C. V. 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.

FIALHO, E.T.; SOBESTIANSKY, J.; BELLAYER, C.; WENTZ, I. Análise proximal e ocorrência de salmonelas em alimentos e concentrados protéicos utilizados em rações de suínos. Comunicado técnico Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves, v. 87, p. 1-4, 1985.

GALLAND, J. C.; HOUSE, J. K.; HYATT, D. R.; HAWKINS, L. L.; ANDERSON, N. V.; IRWIN, C. K.; SMITH, B. P. Prevalence of *Salmonella* in beef feeder steers as determined by bacterial culture and ELISA serology. **Veterinary of Microbiology**, v. 76, p. 143-151, 2000.

GAUL, S. B.; WEDEL, S.; ERDMAN, M. M.; HARRIS, D. L.; HARRIS, I. T.; FERRIS, K.E.; HOFFMAN, L. Use of Pulsed-Field Gel Electrophoresis of Conserved *Xba*I Fragments for Identification of Swine *Salmonella* Serotypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 472-476, 2007.

GEBREYES, W. A.; ALTIER, C.; THAKUR, S. Molecular epidemiology and diversity of *Salmonella* serovar Typhimurium in pigs using phenotypic and genotypic approaches. **Epidemiology Infection**, v. 134, p. 187-198, 2006.

GIBSON, J. R.; SLATER, E.; XERRY, J.; TOMPKINS, D. S.; OWEN, R. J. Use of an amplified-fragment length polymorphism technique to fingerprint and differentiate isolates of *Helicobacter pylori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 2580-2585, 1998.

GIROTTI, A. F. Suínos: análise do desempenho atual. **Anuário 2006 da Suinocultura Industrial**, v. 28, n. 1, p. 16-23, 2006.

HABU, Y.; FUKUDA-TANAKA, S.; HISATOMI, Y.; LIDA, S. Amplified restriction fragment length polymorphism- based mRNA fingerprinting using a single restriction enzyme that recognizes a 4-bp sequence. **Biochemistry Biophysics Research Communication**, v. 234, n. 2, p. 516-521, 1997.

HALD, T.; WEGENER, H. C. Quantitative assessment of the sources of human salmonellosis attributable to pork. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON THE EPIDEMIOLOGY AND CONTROL OF *SALMONELLA* IN PORK, 1999, Washington. **Proceedings...**, Urbana-Champaign: University of Illinois, 1999. v. 3, p. 200-205.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal Medical Microbiology**, v. 294, p. 95-102, 2004.

HEUM, M.; SCHAEFER PREGL, R.; KLANAN, D.; CASTAGNA, R.; ACCERBI, M.; BORGHI, B.; SALAMINI, F. Site of cinkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. **Science**, v. 278, p. 1312-1314, 1997.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.; STANLEY, J. T.; WILLIAM, S. T. Bergey's Manual of Determinative bacteriology. 9 th edn. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 175-189, 1994.

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

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

IKUTA, N.; FONSECA, A.; LUNGE, V. R.; MARQUES, E. K. Uso de técnicas moleculares para diagnóstico de doenças em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. p.85-89.

JAKABI, M.; BUZZO, A. A.; RISTORI, C. A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A. M. R.; GELLI, D. S. Observações Laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp ocorridos na Grande São Paulo no período de 1994 a 1997. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 58, p. 47-51, 1999.

JANSEEN, P.; MAQUELIN, K.; COOPMAN, R.; TJERNBERG, I.; BOUVET, P.; KERSTERS, K.; DIJKSHOORN, L. Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. **International Journal System Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1179-1187, 1997.

KICH, J. D. Salmonelose. In: SOBESTIANSKY, J.; BARCELLOS, D. (Eds). **Doença dos Suínos**. Goiânia: Cãnone, 2007, p. 196-203.

KICH, J. D.; MORES, N.; PIFFER, I. A.; COLDEBELLA, A.; AMARAL, A.; RAMMINGER, L. ; CARDOSO, M. Fatores associados a soroprevalência de *Salmonella* em rebanhos comerciais de suínos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 398-405, 2005.

KOELEMAN, J. G. M.; PARLEVLIET, G. A.; DIJKSHOORN, L.; SAVELKOUL, P. H. M.; VANDERBROUCKE-GRAULS, M. J. E. Nosocomial outbreak of multi-resistant *Acinetobacter baumannii* on a surgical ward: epidemiology and risk factors for acquisition. **Journal Hospital Infection**, v. 37, n. 2, p. 113-123, 1997.

KOELEMAN, J. G. M.; STOOF, J.; BIESMANS, D.J.; SVELKOU, P. H. M.; VANDERBROUCKE-GRAULS, M. J. E. Comparison of ARDRA, RAPD and AFLP fingerprinting for identification of *Acinetobacter* genomics species and typing of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 9, p. 2522-2529, 1998.

LAZARO, N. S., TIBANA, A., HOFER, E. *Salmonella* spp. in healthy swine and in abattoir environments in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 60, n. 9, p. 1029-1033, 1997.

LETELLIER, A.; MESSIER, S.; QUESSY, S. Prevalence of *Salmonella* spp. And *Yersinia enterocolitica* in finishing swine at Canadian abattoirs. **Journal of food Protection**, v. 62, n. 1, p. 22-25, 1999.

LIU, S.; SANDERSON, K. E. A Physical map of the *Salmonella* typhimurium LT2 genome Made by using *Xba*I analysis. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 5, p. 1662-1672, 1992.

MCLAUCHLIN, J.; RIPABELLI, G.; BRETT, M. M.; THRELFALL, E. J. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Clostridium perfringens* for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 21-28, 2000.

MORROW, W. E. M., DAVIES, P. R.; SEE, T.; EISEMANN, J.; ZERING, K.; KIHISTROM, S.; KARLI, K. The prevalence of *salmonella* spp. in feces on the farm and in ceca at slaughter. In: International Pig Veterinary Society Congress, 16., 2000, Melbourne, Australia. **Proceedings...** 2000, p. 207.

NEIVA, C. Incidência de salmonelas em suínos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIA, 3., 1946, Porto Alegre, RS, [anais]... p. 430-435.

NIELSEN, B.; BAGGESEN, D.; BAGER, F.; HAUGEGAARD, J.; LIND, P. The serological response to *Salmonella* serovars Typhimurium and Infantis in experimentally infected pigs: the time course followed with an indirect anti-LPS ELISA and bacteriological examinations. **Veterinary of Microbiology**, v. 47, p. 205-218, 1995.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annual Review Medicine**, v. 52, p. 259-274, 2001.

OLIVE, D. M., BEAN, P. Principles and application of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

POPOFF M.Y.; BOCKEMUHL, J.; BRENNER, F. W. Supplement 1997 (no. 41) to the Kauffmann-White Scheme. **Research in Microbiology**, v. 149, n. 8, p. 601-604, 1998.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. **Antigenic formula of the *salmonella* serovars**, 7. rev. Paris, France: WHO, 1997.

QUINN, P. J., CARTER, M. E., MARKEY, B. K.; CARTER, G.R. **Clinical veterinary microbiology**, London: Wolfe Publishing. 1994, 648 p.

ROBERTS, T. Human illness costs of food born bacteria. **American Journal of Agricultural Economics**, Lexington, v. 71, p. 468-474, 1989.

SAVELKOUL, P. H. M.; AARTS, H. J. M.; DE HAAS, J.; DIJKSHOORN, L.; DUIM, B.; OTSEN, M.; RADEMAKER, J. L. W.; SCHOULS, L.; LENSTRA, J. A. Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 10, p. 3083-3091, 1999.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Review**, v. 7, p.14-56, 2004.

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

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, B. E.; D'ALLAIRE, S.; MENGELING, W. L. (Eds). **Diseases of swine**. 8th ed. Ames: Iowa State University Press, 2000, p. 535-551.

SILVA, L. E.; GOTARDI, C.; MOSTARDEIRO, P.; SANTIN, K.; VIZZOTO, R.; KICH, J.; NADVORNI, A; CARDOSO, M. Estudo longitudinal da infecção por *Salmonella* em um sistema integrado de produção de suínos. In: CONGRESSO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 11., 2003, Goiânia. **Anais...**Goiânia: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2003, p. 61-62.

STONE, G. G.; OBERST, R. D.; HAYS, M. P.; MCVEY, S.; CHENGAPPA, M. M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1742-1749, 1994.

STRECK, A. F.; VAZ, C. S. L.; MARKS, F. S.; OLIVEIRA, S. D.; CARDOSO, M. R. I.; CANAL, C. W. Analise do poder discriminatório da SE-AFLP para *Salmonella* Enteritidis frente a outras técnicas fenotípicas e genotípicas. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 1, n. 35, p. 73-78, 2007.

SOOD, S.; PETERS, T.; WARD, L. R.; THRELFALL, E. J. Combination of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP) for differentiation of multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Clinical of Microbiology Infection**, v.8, p. 154-161, 2002.

TIELEN M. J. M.; VAN SCHIE F. W.; VAN DER WOLF P. J.; ELBERS A. R. J.; KOPPENS J. M. C. C.; WOLBERS W. B. Risk factors and control measures for subclinical *Salmonella* infection of pig herds. In: **Symposium on the Epidemiology and Control of Salmonella in Pork**, 2., 1997, Copenhagen, Dinamarca. p. 32-35.

TORENSMA, R.; VISSER, M. J.; AARSMAN, C. J.; POPPELIER, M. J.; VAN BEURDEN, R.; FLUIT, A. C.; VERHOEF, J. Monoclonal antibodies that detect live salmonellae. **Applied and Enviromental Microbiology**, v. 58, n. 12, p. 3868–3872, 1992.

VALSAGIACOMO, C.; BAGGI, F.; GAIA, V.; BALMELLI, T.; PEDUCI, R.; PIFFARETTI, J. Use of amplified fragment length polymorphism in molecular typing of *Legionella pneumophila* and application to epidemiological studies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1716-1719, 1995.

VAN ASTEN, A. J. A. M; VAN DIJK, J. E. Distribution of classic virulence factors among *Salmonella* spp. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 44, p. 251-259, 2005.

VAN DER GAAG, M. A.; VOS, F.; SAATKAMP, H. W.; BOVEN, M. V.; BEEK, P. V.; HUIRNE, R. B. A state-transition simulation model for the spread of *Salmonella* in the pork supply chain. **European Journal of Operations Research**, v. 156, p. 782-798, 2004.

VANEECHOUTTE, M. DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. **Molecular Biotechnology**, v. 6, n. 2, p. 115-142, 1996.

VELAPPAN, N.; SNODGRASS, J. L.; HAKOVIRTA, J. R.; MARRONE, B. L.; BURDE, S. Rapid identification of pathogenic bacteria by single-enzyme amplified fragment length polymorphism analysis. **Diagnostic Microbiology Infection Diseases**, v. 39, p. 77-83, 2001.

WEGENER, H. C.; BAGER, F. Pork as a source of human salmonellosis. In: **International Symposium on Epidemiology and Control of *salmonella* in Pork**, 2., 1997. Copenhagen. Proceedings... Copenhagen: The Royal Veterinary and Agricultural University, 1997, p. 3-8.

WEISS, L. H. N.; NONNIG, R.; CARDOSO, M.; COSTA, M. Ocorrência de *Salmonella* sp em suínos de terminação no Rio grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 104-108, 2002.

WILLIAMS, J. R. L.P.; NEWELL, K. W. *Salmonella* excretion in joy-riding pigs. **American Journal Pig Healt**, v. 60, n. 5, p. 926-929, 1970.