UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Tipagem molecular e análise da diversidade genética de linhagens
de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, alimentos e frangos
no Brasil**

Fábio Campioni

**Ribeirão Preto
2013**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Tipagem molecular e análise da diversidade genética de linhagens
de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, alimentos e frangos
no Brasil**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas
à Farmácia, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas
à Farmácia.

Orientado: Fábio Campioni

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

**Ribeirão Preto
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Campioni, F.

Tipagem molecular e análise da diversidade genética de linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, alimentos e frangos no Brasil. Ribeirão Preto, 2013.
116p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Pfrimer Falcão

1. *Salmonella* Enteritidis
2. salmonelose
3. tipagem molecular
4. genes de virulência
4. Resistência a antimicrobianos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Fábio Campioni

Título do trabalho: Tipagem molecular e análise da diversidade genética de linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, alimentos e frangos no Brasil

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Juliana Pfrimer Falcão

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

À meus pais Luvercy e Ivanilde por todo apoio e incentivo em mais essa etapa.

Agradecimentos

À Deus por toda força espiritual nas conquistas e nos momentos de dificuldade;

À profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão por toda a formação científica e profissional que me deu, por estar sempre presente em todas as etapas depositando grande confiança em mim. Muito Obrigado.

Aos meus irmãos Roger, Cristiane e Simone por todo apoio e companheirismo;

À Alessandra Antunes Martins por estar sempre ao meu lado em todos os momentos;

Aos amigos do laboratório Carol, Fernanda, Miliane, Priscilla e Roberto pelo companheirismo, amizade, ajuda e colaboração;

Ao prof. Dr. Devendra H. Shah por ter me recebido em seu laboratório nos Estados Unidos e me ensinado a metodologia de MLVA;

À Gail Deckert, por todo apoio técnico e também por toda ajuda pessoal durante o período em que estive nos Estados Unidos;

À Jaqueline Passaglia e Eliane Figueiredo pelo apoio técnico no decorrer desse trabalho bem como pela amizade no decorrer desse trabalho;

À Vânia Cláudia de Albuquerque pelo auxílio administrativo e com o resumo em espanhol e também pela amizade ao longo desse trabalho;

À Roberto Antonio de Souza pela ajuda nos experimentos de HRMA;

À André Pitondo da Silva pela ajuda nas análises de MLST;

Aos funcionários da FCFRP-USP em especial os funcionários da pós-graduação Henrique, e Rosana que muito me ajudaram sempre que precisei;

À Alzira Maria Moratto Bergamini, Marta Inês Cazentini Medeiros e Maria Aparecida de Oliveira, pesquisadoras do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto por terem cedido as linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos e alimentos utilizadas nesse estudo;

À Mariana Mamede Zoldan, ex-funcionária da AVIPA por ter cedido as linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de frangos utilizadas nesse estudo;

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas por permitir que os experimentos de sequenciamento fossem realizados no Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática – Sala de Sequenciamento de Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP/USP) nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto;

À Adriana Aparecida Marques e Cristiane Ayres Ferreira, funcionárias da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelos sequenciamentos realizados;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de doutorado (Proc. 2009/09998-9) e pelo suporte financeiro desse projeto de pesquisa (Proc. 2008/57478-1), bem como por todo o suporte financeiro ao laboratório;

À CAPES pela concessão da bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) (Proc. 1279-12-2).

Finalmente agradeço a todos que direta ou indiretamente colaboraram com a realização desse trabalho.

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios de pesquisa:

Laboratório de Epidemiologia Molecular, Virulência e Genômica de Bactérias de Importância Clínica do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP/USP), onde foram realizados todos os experimentos do presente estudo com exceção da metodologia de *Multilocus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA), sob a orientação da profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão.

Laboratório de Doenças Bacterianas Transmitidas via Água e Alimentos e Doenças Infecciosas de Aves do Departamento de Microbiologia e Patologia Veterinária da *Washington State University* em Pullman, WA, Estados Unidos, onde foram realizados os experimentos de *Multilocus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA), sob a orientação do prof. Dr. Devendra H. Shah.

RESUMO

CAMPIONI, F. **Tipagem molecular e análise da diversidade genética de linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, alimentos e frangos no Brasil 2013.** 123f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2013.

A doença decorrente da infecção por *Salmonella* é um dos maiores problemas de saúde no mundo em termos de morbidade e mortalidade. Entre as sorovariedades de *Salmonella*, a sorovariedade Enteritidis é a de maior ocorrência mundial e compreende linhagens que tem seu nicho biológico relacionado a frangos e ovos. Várias metodologias de tipagem fenotípicas e genotípicas foram desenvolvidas a fim de se delinear a epidemiologia das infecções por *S. Enteritidis*. Entretanto a tipagem fenotípica usualmente falha em discriminar linhagens relacionadas das não-relacionadas epidemiologicamente e apresenta problemas de reprodutibilidade que foram minimizados com a utilização de métodos genotípicos. No Brasil, poucos estudos que utilizaram técnicas moleculares na tipagem de linhagens dessa sorovariedade foram realizados. Os objetivos desse estudo foram investigar o potencial patogênico, a resistência a antimicrobianos e realizar a tipagem molecular de linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, de alimentos e de frangos no Brasil. Para isso foram estudadas 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos e de casos esporádicos, de humanos (67) de alimentos (61) e de frangos (60), durante o período de 1986 a 2010, de vários locais do Brasil. A susceptibilidade frente a 14 antimicrobianos foi analisada através da técnica de disco difusão e a presença de 13 genes de virulência das ilhas de patogenicidade de *Salmonella* I e II e do plasmídeo *pSEV* foram pesquisados por PCR. Os mecanismos de resistência a quinolonas foram verificados através da pesquisa de genes de resistência plasmidiais e cromossômicos e também através da verificação de mutações no gene *gyrA* por *High resolution melting analysis* (HRMA) seguida de sequenciamento de algumas linhagens. As linhagens também foram tipadas molecularmente pelas metodologias *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR), *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) com a enzima *XbaI*, *Multilocus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) e por *Multilocus sequence typing* (MLST). Das 188 linhagens estudadas, 42,5% foi resistente ao ácido nalidíxico e somente 0,5% foi resistente a sulfametoxazol-trimetoprima e estreptomicina. A resistência a quinolonas foi relacionada principalmente a mutações no gene *gyrA*. A maioria das linhagens estudadas (98,4%) apresentou todos os genes de virulência pesquisados, sendo uma linhagem negativa para o gene *sipA* e duas linhagens negativas para o gene *prot6E*. ERIC-PCR dividiu as 128 linhagens isoladas de humanos e alimentos em 55 perfis diferentes com similaridade >79,7%. PFGE dividiu essas mesmas linhagens em 68 perfis diferentes com uma similaridade >73,1%. Para as linhagens isoladas de frango, o dendrograma concatenado de ERIC-PCR e PFGE dividiu as 60 linhagens em dois grandes grupos com 73,3% de similaridade. O grupo A consistiu de linhagens isoladas tanto de material clínico de frangos (23) quanto do ambiente da granja (5) com 81,2% de similaridade. O grupo B também consistiu de linhagens isoladas tanto de casos clínicos de frangos (21) quanto do ambiente da granja (11) com 81,1% de similaridade. MLVA dividiu as 188 linhagens isoladas no Brasil e outras 100 linhagens isoladas na América do Norte em dois grandes grupos. O grupo MLVA-A apresentou 71 linhagens isoladas na América do Norte e somente três linhagens isoladas no Brasil. Essas linhagens do

Brasil incluíram as isoladas antes do início da pandemia de *S. Enteritidis* se iniciar no país. Em contraste, o grupo MLVA-B agrupou 185 linhagens isoladas no Brasil e 29 linhagens isoladas na América do Norte. As linhagens presentes no grupo A, foram divididas em 34 tipos genéticos diferentes com similaridade maior do que 46%, enquanto no grupo B as linhagens se diferenciaram em 15 tipos genéticos diferentes com mais de 66% de similaridade. MLST caracterizou 44 das 46 linhagens estudadas como pertencentes ao ST 11. As outras duas linhagens apresentaram alelos que não existiam no banco de dados e caracterizaram dois novos STs, o 1632 e o 1633. Os resultados de tipagem molecular obtidos por ERIC-PCR, PFGE e MLVA no presente estudo, demonstraram uma alta similaridade genotípica entre linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Brasil, o que sugere que as linhagens estudadas descendem de um precursor comum que pouco se diferenciou genotipicamente ao longo de 24 anos no país. Ademais, os resultados de MLVA sugerem que um novo e prevalente subtipo foi introduzido no Brasil após 1993 e tem contaminado alimentos e infectado humanos e animais. O grande número de genes de virulência encontrados reforça o potencial das mesmas causarem doenças em humanos e animais, bem como, os riscos de sua presença em alimentos. Ademais, a grande porcentagem de linhagens resistentes ao ácido nalidíxico observadas a partir de 1996 sugere o uso de quinolonas no tratamento de infecções em animais causadas por *S. Enteritidis* no Brasil.

Palavras-Chaves: *Salmonella* Enteritidis; salmonelose; tipagem molecular; genes de virulência; resistência a antimicrobianos

ABSTRACT

CAMPIONI, F. **Molecular typing and analysis of the genetic diversity of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from humans, food and chickens in Brazil** 2013. 123p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2013.

The disease caused by the infection by *Salmonella* is one of the major health problems worldwide in terms of morbidity and mortality. Among the *Salmonella* serovars, the Enteritidis is the most frequent isolated one and comprises strains that have their biological niche related to chickens and eggs. Several phenotypic and genotypic methodologies were developed to trace epidemiologically the infections by *S. Enteritidis*. However, the phenotypic typing usually fails to discriminate related from unrelated epidemiologically strains and presents problems of reproducibility that were minimized with the introduction of genotypic methods. In Brazil, few studies that used molecular typing techniques to type strains of this serovar were conducted. The aims of this study were to investigate the pathogenic potential, the antimicrobial resistance and to molecularly type of *Salmonella* Enteritidis strains isolated from humans, food and chickens in Brazil. For this, it was studied 188 strains of *Salmonella* Enteritidis isolated from outbreaks and sporadic cases, from humans (67), food (61) and chickens (60), during the period of 1986 to 2010, from various places of Brazil. The susceptibility to 14 antimicrobials were analyzed by the disc diffusion technique and the presence of 13 virulence genes of the *Salmonella* pathogenicity islands I and II and from the *pSEV* plasmid were searched by PCR. The mechanisms of resistance to quinolones were verified by the search of plasmidial and chromosomal resistance genes and also by the verification of mutations in the *gyrA* gene by High resolution melting analysis (HRMA) followed by sequencing of some strains. The strains were also molecularly typed by the methodologies Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR), Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) using the enzyme *Xba*I, Multilocus variable-number tandem repeat analysis (MLVA) and by Multilocus sequence typing (MLST). From the 188 strains studied, 42.5% were resistant to nalidixic acid and only 0.5% were resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim and streptomycin. Resistance to quinolones was related mainly to mutations in the *gyrA* gene. The majority of the strains studied (98.4%) harbored all the virulence genes searched, being only one strain negative for the *sipA* gene and two strains negative for the *prot6E* gene. ERIC-PCR divided the 128 strains isolated from humans and food in 55 different profiles with >79.7% of similarity. PFGE divided the same strains in 68 different profiles with a similarity of >73.1%. Regarding the strains isolated from chickens, the concatenated dendrogram of ERIC-PCR and PFGE divided the 60 strains in two major groups with a similarity of 73.3%. Group A consisted of strains isolated either from chicken's clinical samples (23) or from the farm environment (5) with a similarity of 81.2%. Group B also consisted of strains isolated either from chicken's clinical samples (21) or from the environment (11) with a similarity of 81.1%. MLVA divided the 188 strains isolated in Brazil and other 100 strains isolated from North America in two major groups. MLVA-A group consisted of 71 strains isolated in North America and only three strains isolated in Brazil. These strains from Brazil included the ones isolated before the beginning of the pandemic of *S. Enteritidis* in this country. In contrast, MLVA-B group clustered 185 strains isolated in Brazil and 29 strains isolated in North America. The strains in the MLVA-A group were divided in 34 different genotypic types with a similarity of 46%, while strains in

the group B were divided in 15 different genotypic types with a similarity of 66%. MLST characterized 44 of the 46 strains studied as belonging to ST 11. The other two strains presented new alleles that characterized two new STs, the 1632 and the 1633. The results of molecular typing obtained by ERIC-PCR, PFGE and MLVA in this study showed a high genotypic similarity among *S. Enteritidis* strains isolated in Brazil, which suggests that the strains studied descend from a common ancestor that differed little genotypically during 24 years in the country. Moreover, the results of MLVA suggest that a new and prevalent subtype was introduced in Brazil after 1993 and has been contaminating food and infecting humans and animals. The high prevalence of virulence genes found in the strains studied reinforce their potential to cause disease in humans and animals, as well as the risks of their presence in food. Moreover, the high percentage of strains resistant to nalidixic acid observed after 1996 suggests the use of quinolones in the treatment of animal infections by *S. Enteritidis* in Brazil.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis; salmonelose; molecular typing; virulence genes; antimicrobial resistance

RESUMEN

CAMPIONI, F. **Tipaje molecular y análisis de la diversidad genética de linajes de *Salmonella* Enteritidis aisladas humanos, alimentos y pollos en Brasil.** 2013. 123f. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, 2013.

La enfermedad recurrente de la infección por *Salmonella* es uno de los mayores problemas de salud en el mundo en términos de morbilidad y mortalidad. Entre las serovariedades de *Salmonella*, Enteritidis es la serovariedad de ocurrencia mundial y comprende linajes que tienen su nicho biológico relacionado a pollos y huevos. Varias metodologías fenotípicas y genotípicas de tipaje fueron desarrolladas, con la finalidad de delinear la epidemiología de las infecciones por *S. Enteritidis*. El tipaje fenotípico usualmente falla en discriminar los linajes relacionados de los no-relacionados epidemiológicamente y presenta problemas de reproducibilidad, que fueron minimizados con la utilización de métodos genotípicos. En Brasil fueron realizados pocos estudios que utilizaron técnicas moleculares en el tipaje de linajes de esa serovariedad. El objeto de ese estudio fue investigar el potencial patogénico, la resistencia a los antimicrobianos y realizar el tipaje molecular de linajes de *Salmonella* Enteritidis aisladas de humanos, de alimentos y de pollos en Brasil. Para tanto, fueron estudiados 188 linajes de *Salmonella* Enteritidis aisladas de ramalazos y de casos esporádicos de humanos (67), de alimentos (61) y de pollos (60), a lo largo del 1986 al 2010, de varios locales de Brasil. La susceptibilidad frente a 14 antimicrobianos fue analizada por medio de la técnica difusión por disco y la presencia de 13 genes de virulencia de las islas de patogenicidad de *Salmonella* I y II y del plásmido *pSEV* fueron pesquisados por PCR. Los mecanismos de resistencia a las quinolonas, fueron verificados por medio de la pesquisa de genes de resistencia plasmidiales y cromosomales, además de la verificación de mutaciones en el gene *gyrA* por *High resolution melting analysis* (HRMA) seguido de la secuenciación de algunos linajes. Los linajes también fueron tipificados molecularmente por las metodologías *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR), *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) con la enzima *XbaI*, *Multilocus variable-number tandem repeat analysis* (MLVA) y por *Multilocus sequence typing* (MLST). De los 188 linajes estudiados, 42,5% fue resistente al ácido nalidíxico y solamente 0,5% fue resistente a trimetoprim-sulfametoxazol y estreptomicina. La resistencia a las quinolonas fue relacionada principalmente a mutaciones del gene *gyrA*. La mayoría de los linajes estudiados (98,4%) presentó todos los genes de virulencia investigados, siendo un linaje negativo para el gene *sipA* y dos linajes negativos para el gene *prot6E*. ERIC-PCR dividió los 128 linajes aislados de humanos y de alimentos en 55 perfiles distintos con similaridad >79,7%. PFGE dividió esos mismos linajes en 68 perfiles distintos con una similaridad >73,1%. Para los linajes aislados de pollo, el dendograma concatenado de ERIC-PCR y PFGE dividió los 60 linajes en dos grandes grupos con 73,3% de similaridad. El grupo A consistió de linajes aislados tanto de casos clínicos de pollos (23) cuanto del ambiente de la granja (5) con 81,2% de similaridad. El grupo B también consistió de linajes aislados tanto de casos clínicos de pollos (21) cuanto del ambiente de la granja (11) con 81,1% de similaridad. MLVA dividió los 188 linajes aislados en Brasil y otros 100 linajes aislados en Norteamérica en dos grandes grupos. El grupo MLVA-A presentó 71 linajes aislados en Norteamérica y solamente tres linajes aislados en Brasil. Esos linajes de Brasil agregaron los aislados antes del inicio de la

pandemia de *S. Enteritidis* en ese país. En contraste, el grupo MLVA-B agrupó 185 linajes aislados en Brasil y 29 linajes aislados en Norteamérica. Los linajes presentes en el grupo A fueron divididos en 34 distintos tipos genéticos con similaridad mayor que 46% entre las mismas, mientras en el grupo B los linajes se diferenciaron en 15 distintos tipos genéticos con más de 66% de similaridad. MLST caracterizó 44 de los 46 linajes estudiados como pertenecientes al ST 11. Los otros dos linajes presentaron alelos que no existían en el banco de datos y caracterizaron dos nuevos STs, el 1632 y el 1633. Los resultados del tipaje molecular obtenidos en el presente estudio demostraron una alta similaridad genotípica entre linajes de *S. Enteritidis* aislados en Brasil, lo que sugiere que los linajes estudiados descienden de un precursor común que poco se diferenció genotípicamente a lo largo de 24 años en Brasil. Además, un nuevo y prevalente subtipo fue introducido en Brasil pos 1993 y ha contaminado alimentos e infectado humanos y animales.. El gran número de genes de virulencia encontrados refuerza el potencial de las mismas causaren enfermedades en humanos y animales, así como los riesgos de su presencia en alimentos. Aún, el gran porcentaje de linajes resistentes al ácido nalidíxico observados a partir de 1996 sugiere el uso de quinolonas en el tratamiento de infecciones en animales por *S. Enteritidis* en Brasil.

Palabras-llaves: Salmonelosis; *Salmonella* Enteritidis; Tipaje molecular; genes de virulencia; resistencia a los antimicrobianos

Lista de abreviaturas e siglas

A	Adenina
ASM	Do inglês <i>American Society for Microbiology</i>
AVIPA	Avicultura Integral e Patologia S/A
BHI	Do inglês <i>Brain Heart Infusion</i>
C	Citosina
CC	Complexo Clonal
CDC	Do inglês <i>Center for Disease Control</i>
CHEF	Do inglês <i>countor-clamped homogeneous eletric field</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Do inglês <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DLV	Do inglês <i>double locus variant</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERIC	Do inglês <i>Enterobacterial repetitive intergenic consensus</i>
G	Guanina
<i>gyrA</i>	Subunidade α da DNA girase
<i>gyrB</i>	Subunidade β da DNA girase
HRMA	Do ingles <i>High-resolution melting analysis</i>
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IPS	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>
MLST	Do inglês <i>Multilocus Sequence Typing</i>
MLVA	Do inglês <i>Multilocus variable-number tandem-repeat analysis</i>
mRNA	RNA mensageiro
<i>parC</i>	Subunidade C da Topoisomerase IV
<i>parE</i>	Subunidade E da Topoisomerase IV
PCR	Do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	Do inglês <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pmol	Picomol
<i>pSEV</i>	Do inglês <i>plasmid for Salmonella Enteritidis virulence</i>
QRDR	Do inglês <i>Quinolone Resistance Determining Region</i>
RNA	Ácido Ribonucleico

SST3	Sistema de Secreção do Tipo 3
SOP	Do inglês <i>Salmonella outer proteins</i>
SCV	Do inglês <i>Salmonella containing vacuole</i>
SLV	Do inglês <i>single locus variant</i>
ST	Do inglês sequence typing
T	Timina
TAE	Tris acetato EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano
UPGMA	Do inglês <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
VNTR	Do inglês <i>variable number of tandem repeat</i>

Lista de símbolos

%	Porcentagem
Σ	Somatório
°C	Graus centígrados
®	Registrado
>	Maior
<	Menor
cm	Centímetro
Kb	quilobase
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MgSO₄	Sulfato de Magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
pb	Pares de base
pH	Potencial Hidrogeniônico
U	Unidades
V	Volts
UV	Ultravioleta
TM	Do inglês Trademark

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Número atual de sorovariedades em cada espécie e subespécie de <i>Salmonella</i>	3
Tabela 2 -	Reações bioquímicas utilizadas na diferenciação das espécies e subespécies de <i>Salmonella</i>	4
Tabela 3 -	Porcentagem de isolamento de diferentes sorovariedades de <i>Salmonella</i> isoladas entre 1970 e 2005 no Estado de São Paulo, Brasil.....	8
Tabela 4 -	Características das 188 linhagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de material clínico de humanos (67), de alimentos (61) e de frangos (60).....	26
Tabela 5 -	Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa de genes por PCR nas linhagens de <i>S. Enteritidis</i> estudadas.....	34
Tabela 6 -	Descrição dos reagentes utilizados no ensaio de ERIC-PCR para <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	39
Tabela 7 -	Perfil de resistência aos antimicrobianos ácido nalidíxico, amicacina, ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, levofloxacina, lomefloxacina, norfloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprima e tetraciclina de 188 linhagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de humanos, de alimentos e de frangos.....	48
Tabela 8 -	Frequência dos genes de virulência <i>invA</i> , <i>sipA</i> , <i>sipD</i> , <i>sopB</i> , <i>sopD</i> , <i>sopE2</i> , <i>ssaR</i> , <i>sifA</i> , <i>spvB</i> , <i>prot6E</i> , <i>flgK</i> , <i>fljB</i> e <i>flgL</i> em 188 linhagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de humanos, alimentos e frangos.....	50

Tabela 9 -	Média das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da ciprofloxacina nas 80 linhagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis resistentes ao ácido nalidíxico em comparação as 20 linhagens sensíveis e comparação das CIMs nos diferentes perfis de mutação no gene <i>gyrA</i>	56

Lista de figuras

- Figura 1 -** Principais agentes etiológicos envolvidos em surtos alimentares no Brasil no período de 2000 a 2011 9
- Figura 2 -** Gel de agarose 0,8% representativo dos produtos da extração do DNA genômico de algumas linhagens de *S. Enteritidis* estudadas. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 10: SE12, SE13, SE18, SE27, SE28, SE29, SE30, SE35, SE36 e SE37, respectivamente..... 49
- Figura 3 -** Gel de agarose 1,5%, representativo da amplificação do gene *sdfI*, de 333pb, em algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaletas de 1 a 18: SE29, SE30, SE32, SE33, SE35, SE36, SE37, SE38, SE39, SE41, SE43, SE48, SE50, SE56, SE59, SE60, SE66, SE67, respectivamente 49
- Figura 4 -** Perfis de *melting* resultantes das análises de HRMA para as 80 linhagens resistentes e 20 linhagens sensíveis de *Salmonella* Enteritidis ao ácido nalidíxico 52
- Figura 5 -** Perfis de *melting* resultantes das análises de HRMA para as 13 linhagens de *Salmonella* Enteritidis pertencentes ao perfil D e para as 51 linhagens pertencentes ao perfil E 52
- Figura 6 -** Gel de agarose 1,5%, representativo da amplificação de parte do gene *gyrA* em algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaletas de 1 a 18: SE29, SE30, SE32, SE33, SE35, SE36, SE37, SE38, SE39, SE41, SE43, SE48, SE50, SE56, SE59, SE60, SE66, SE67, respectivamente..... 54
- Figura 7 -** Sequências representativas das linhagens sequenciadas de cada perfil gerado por HRMA e sequência padrão do gene *gyrA* de *Salmonella* disponível no Gene Bank A: perfil resistente A, S: perfil linhagens sensíveis, P: sequência padrão *gyrA*, E: perfil resistente E, D: perfil resistente D, B: perfil resistente B..... 54

- Figura 8 -** Géis de agarose 1,5%, representativos da amplificação do gene plasmidial *qnrB*, de 513 pb, em duas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaleta 5: SE 107/09 e canaleta 24: SE191/10 55
- Figura 9 -** Placas representativas do ensaio com o Etest® de ciprofloxacina para uma linhagem resistente (SE 211, esquerda) com concentração inibitória mínima de 0,125 µg/mL e uma sensível ao ácido nalidíxico (SE 120, direita) com concentração inibitória mínima de 0,002 µg/mL 56
- Figura 10 -** Gel de agarose 1,5%, representativo dos produtos de amplificação das sequências ERIC de algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaletas de 1 a 17: SE28, SE29, SE30, SE32, SE33, SE35, SE36, SE37, SE38, SE39, SE41, SE43, SE48, SE50, SE56, SE59 e SE60, respectivamente..... 57
- Figura 11 -** Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do padrão de bandas obtido por ERIC-PCR para 128 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas isoladas de humanos (67) e alimento (61)..... 59
- Figura 12 -** Gel de agarose 1,0%, representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas após clivagem com a enzima *Xba*I. M: marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England). Canaletas de 1 a 12: SE125, SE126, SE127, SE128, SE129, SE130, SE131, SE132, SE133, SE134, SE 135 e SE 136, respectivamente 61
- Figura 13 -** Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do padrão de bandas obtido pelo PFGE com a enzima *Xba*I para 128 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas isoladas de humanos (67) e alimentos (61) 63
- Figura 14 -** Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir dos padrões de bandas gerados por ERIC-PCR e PFGE com a enzima *Xba*I para as 60 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas relacionadas a frangos isoladas de material clínico (44) e do ambiente da granja (16) 66

- Figura 15 -** Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA e coeficiente categórico a partir dos dados de MLVA para as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos (67), alimentos (61) e frangos (60) no Brasil e 100 linhagens isoladas de humanos (48) e frangos (52) na América do Norte 68
- Figura 16 -** Gel de agarose 1,5%, representativo da amplificação do gene *aroC* em algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas M: marcador marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18: SE4 (1), SE5(2), SE11 (3), SE13 (4), SE15 (5), SE16 (6), SE36 (7), SE60 (8), SE66 (9), SE70 (10), SE80 (11), SE86 (12), SE88 (13), SE94 (14), SE114 (15), SE117 (16), SE120 (17), SE133 (18), respectivamente..... 72
- Figura 17 -** Alinhamento e análise de sequências do gene *sucA* de *Salmonella* Enteritidis pelo programa *ChromasPro*. A seta indica uma mutação pontual 73
- Figura 18 -** Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com os dados de todas as 4.892 linhagens de *Salmonella enterica* disponíveis no banco de dados e com as 46 linhagens de *S. Enteritidis* estudadas pertencentes ao ST 11. Em vermelho estão os demais STs de *S. Enteritidis* do banco de dados; azul, STs centrais de complexos clonais; amarelo, realça o início de novos complexos clonais; preto, demais linhagens de *S. enterica*. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens..... 74
- Figura 19 -** Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com as 46 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas e todas as demais 304 linhagens de *S. Enteritidis* do banco de dados. O ST 11 foi o encontrado para 44 das 46 linhagens de *S. Enteritidis* estudadas; Os STS 1632 e 1633 foram os dois novos STs encontrados nesse estudo; em azul, ST central de complexos clonais; preto, demais linhagens de *S. enterica*. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens 75

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract	iii
Resumen.....	v
Lista de abreviaturas e siglas	vii
Lista de símbolos.....	ix
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xii
1. Introdução	1
1.1 Gênero <i>Salmonella</i>	2
1.2 Características do micro-organismo	4
1.3 <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i>	5
1.4 <i>Salmonella enterica</i> subespécie <i>enterica</i> sorovariedade Enteritidis (S. Enteritidis)	6
1.4.1 Mecanismos de contaminação de ovos por S. Enteritidis	9
1.4.2 Patogênese e manifestações clínicas	10
1.4.3 Genes de virulência	11
1.4.4 Resistência a antimicrobianos	13
1.4.4 Métodos de tipagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis	14
1.4.5 <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i> - PCR (ERIC-PCR)	16
1.4.5.1 <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	17
1.4.5.2 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	18
1.4.5.3 <i>Multilocus variable-number tandem-repeat analysis</i> (MLVA)	19
1.4.5.4 <i>High-resolution melting analysis</i> (HRMA)	20
1.5 Relevância do estudo	21
2. Objetivos.....	23
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. Material e métodos.....	25
3.1 Linhagens bacterianas	26

3.2 Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	31
3.3 Armazenamento das linhagens bacterianas.....	32
3.4 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	32
3.5 Extração e verificação da pureza do DNA genômico	32
3.6 Reconfirmação molecular das linhagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	34
3.7 Pesquisa de genes de virulência por PCR	34
3.8 Determinação dos mecanismos de resistência a quinolonas e da concentração inibitória mínima de fluoroquinolonas.....	35
3.8.1 High-resolution melting analysis (HRMA).....	35
3.8.2 Amplificação e sequenciamento da <i>quinolone-resistance-determining-region</i> (QRDR) do gene <i>gyrA</i>	36
3.8.3 Pesquisa de genes plasmidiais de resistência e do gene codificador de bomba de efluxo	38
3.8.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da ciprofloxacina	38
3.9 Amplificação das sequências ERIC para o ensaio de ERIC-PCR.....	38
3.10 Forma de análise de resultados do ERIC-PCR	39
3.11 <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>	40
3.11.1 Forma de análise de resultados do PFGE	41
3.12 Cálculo do índice de dicriminação	42
3.13 Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA).....	42
3.13.1 Amplificação dos loci para MLVA.....	42
3.13.2 Eletroforese capilar	43
3.13.3 Forma de análise dos resultados de MLVA	43
3.15 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	44
3.15.1 Escolha das linhagens	44
3.15.2 Amplificação de genes <i>housekeeping</i>	44
3.15.3 Sequenciamento	45
3.15.4 Forma de análise de resultados do MLST	46
4. Resultados.....	47
4.1 Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	48
4.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos	48
4.3 Extração e verificação da pureza do DNA genômico	48
4.4 Reconfirmação molecular das linhagens de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	49

4.5 Pesquisa de genes de virulência por PCR	50
4.6 Determinação dos mecanismos de resistência a quinolonas e da concentração inibitória mínima de fluoroquinolonas	50
4.6.1 High-resolution melting analysis (HRMA).....	50
4.6.2 Amplificação e sequenciamento da <i>quinolone-resistance-determining-region</i> (QRDR) do gene <i>gyrA</i>	53
4.6.3 Pesquisa de genes plasmidiais de resistência e do gene codificador de bomba de efluxo	54
4.6.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da ciprofloxacina	55
4.7 Amplificação das sequências ERIC para o ensaio de ERIC-PCR	56
4.8 Construção do dendrograma de similaridade genômica com os dados de ERIC-PCR	57
4.9 <i>Pulsed field gel electrophoresis</i> (PFGE).....	61
4.10 Construção do dendrograma de similaridade genômica com os dados de PFGE	61
4.11 Construção dos dendrogramas de similaridade genômica com os dados de ERIC-PCR e PFGE para as linhagens de frangos.....	65
4.12 Índice de discriminação	67
4.13 Construção dos dendrogramas de similaridade genômica com os dados de MLVA.....	67
4.14 <i>Multilocus sequence typing</i> (MLST).....	72
4.14.1 Amplificação de genes <i>housekeeping</i>	72
4.14.2 Sequenciamento	72
4.14.3 Diagramas de similaridade genética gerado com os dados de MLST	73
5. Discussão	76
6. Conclusões.....	91
7. Referências.....	94
Anexos	114

1. INTRODUÇÃO

1.1 - Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae* e foi proposto em 1900 por Lignières, em homenagem ao bacteriologista norte-americano Daniel Elmer Salmon, por ter sido o primeiro a isolar a bactéria *Salmonella choleraesuis*, então chamada *Bacillus choleraesuis*, de intestino de porco em 1884 (SU; CHIU, 2007).

A nomenclatura do gênero *Salmonella* é complexa e tem causado controvérsias ao longo do tempo. Essa nomenclatura se desenvolveu a partir do conceito proposto por Kauffman em 1966, baseado na classificação sorológica dos antígenos O (somático) e H (flagelar) determinada através de antissoros específicos, onde cada sorovariedade era designada como uma espécie separadamente (KAUFFMANN, 1966). Entretanto, algumas linhagens clínicas identificadas antes de 1966 receberam nomes específicos de acordo com a doença que causavam, do animal do qual foram isoladas ou da área geográfica onde foram primeiramente isoladas e foram utilizados sem terem sido adequados ao sistema da fórmula antigênica (BRENNER et al., 2000; SU; CHIU, 2007).

Outras propostas taxonômicas baseadas em características bioquímicas que divide as sorovarietades em subgêneros e também em características genotípicas foram propostas (BRENNER et al., 2000).

A taxonomia de *Salmonella* começou a ser melhor definida em 1973 quando Crosa e colaboradores demonstraram por hibridação DNA-DNA que todas as linhagens de *Salmonella* deveriam pertencer a uma única espécie (CROSA et al., 1973). Em 1982, baseados em relações genotípicas, Le Minor e colaboradores propuseram a divisão da única espécie em seis subespécies (LE MINOR; VÉRON; POPOFF, 1982). Em 1989, também baseado em estudos genotípicos, Reeves e colaboradores separaram a então considerada subespécie bongori em outra espécie (REEVES et al., 1989).

Muito ainda se discute a respeito da nomenclatura de *Salmonella*, entretanto, atualmente a nomenclatura utilizada pela Organização Mundial de Saúde, pelo *Centers for Disease Control* (CDC) e pela *American Society for Microbiology* (ASM), bem como, todas as fórmulas antigênicas das sorovarietades reconhecidas são listadas em um documento chamado *Kauffmann-White scheme*. Esse documento é atualizado periodicamente pelo centro de referência e pesquisa em *Salmonella* da

Organização Mundial de Saúde no Instituto Pasteur na França (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Assim, a última atualização do esquema publicada em 2010, divide o gênero em duas espécies, *Salmonella enterica* (*S. enterica*) e *Salmonella bongori* (*S. bongori*). A espécie *S. enterica* subdivide-se em seis subespécies, *S. enterica* subesp. *enterica* (I), *S. enterica* subesp. *salamae* (II), *S. enterica* subesp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subesp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subesp. *houtenae* (IV) e *S. enterica* subesp. *indica* (VI), e compreende 2587 sorovariedades. Já a espécie *S. bongori* (V) não possui subespécies e compreende 23 sorovariedades (Tabela 1) (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Uma terceira espécie, *Salmonella subterranea*, foi reconhecida em 2005 e deve ser incorporada ao sistema no futuro (SU; CHIU, 2007).

Com relação à forma correta de se escrever o nome do micro-organismo, na primeira citação deve-se escrever o nome completo com gênero, espécie, subespécie e sorovariedade. Nas citações subsequentes, pode-se escrever somente o gênero e a sorovariedade, sendo a última sempre escrita com a primeira letra maiúscula e sem itálico para enfatizar que não se trata de uma espécie e sim de uma sorovariedade (BRENNER et al., 2000).

Tabela 1 – Número atual de sorovariedades em cada espécie e subespécie de *Salmonella*

<i>S. enterica</i>	
subesp. <i>Enterica</i> (I)	1547
subesp. <i>Salamae</i> (II)	513
subesp. <i>Arizonae</i> (IIIa)	100
subesp. <i>Diarizonae</i> (IIIb)	341
subesp. <i>Houtenae</i> (IV)	73
subesp. <i>Indica</i> (VI)	13
<i>S. bongori</i> (V)	23
Total	2610

Extraído de (GUIBOURDENCHE et al., 2010)

Apesar do grande número de sorovariedades existentes no gênero *Salmonella*, a maioria das sorovariedades de importância clínica pertence a *S. enterica* subesp. *enterica* enquanto as sorovariedades pertencentes às outras subespécies e à espécie *S. bongori* são usualmente isoladas dos chamados animais

de sangue frio, como anfíbios e répteis, e também do ambiente (COBURN; GRASSL; FINLAY, 2007; HENDRIKSEN et al., 2011).

1.2 - Características do micro-organismo

O gênero *Salmonella* compreende micro-organismos em forma de bacilos, Gram-negativos, não fermentadores de lactose com tamanho variando de 0,7 a 1,5 µm de diâmetro por 2 a 5 µm de comprimento. Com exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* são móveis com flagelos peritríquios. São fermentadores de D-glicose com produção de ácido e usualmente gás. Outros carboidratos usualmente fermentados são L-arabinose, maltose, D-manitol, L-raminose, D-sorbitol (com exceção da subespécie *indica*), trealose, D-xilose e dulcitol (HENDRIKSEN, 2003; NATARO et al., 2007).

Salmonella é oxidase negativo, catalase positivo, indol e Voges Proskauer (VP) negativos, vermelho de metila e citrato de Simmons positivos, produtor de H₂S e uréia negativo (HENDRIKSEN, 2003; NATARO et al., 2007).

Algumas das características acima são utilizadas para confirmação bioquímica de *Salmonella* (Tabela 2).

Tabela 2 – Reações bioquímicas utilizadas na diferenciação das espécies e subespécies de *Salmonella*^a

Teste	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	
Dulcitol	+	+	+	+	+	d ^o	+
Lactose	-	-	- ^c	+ ^d	-	d ^e	-
o-nitrofenil-β-D-galactopiranosida	-	-	+	+	-	d ^g	+
Salicina	-	-	-	-	+ ^h	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-
Mucato	+	+	+	- ⁱ	-	+	+
Crescimento em KCN	-	-	-	-	+	-	+
Gelatina	-	+	+	+	+	+	-
L(+)-Tartarato (d-tartarato ^j)	+	-	-	-	-	-	-

^a Reações após incubação a 37°C. +, 90% ou mais positivos em 1 ou 2 dias; (+), reação positiva após 3 ou mais dias; -, sem reação (90% ou mais) em 7 dias; d, reações diferentes [+ , (+), -]; KCN, cianeto de potássio.

^b 67% das linhagens testadas positivas

^c 15% das linhagens testadas positivas

^d 85% das linhagens testadas positivas

^e 22% das linhagens testadas positivas

^f 15% das linhagens testadas positivas

^g 44% das linhagens testadas positivas

^h 60% das linhagens testadas positivas

ⁱ 30% das linhagens testadas positivas

^j Tartarato de sódio e potássio

Adaptado de (Nataro et al., 2007)

1.3 - *Salmonella enterica* subespécie *enterica*

A doença decorrente da infecção por *Salmonella* é um dos maiores problemas de saúde no mundo em termos de morbidade e mortalidade. A cada ano no mundo, é estimado que ocorram 93,8 milhões de casos de salmonelose, causando aproximadamente 155 mil mortes. A maioria desses casos ocorre através da ingestão de alimentos contaminados (MAJOWICZ et al., 2010).

As linhagens pertencentes à subespécie *enterica* são as mais isoladas de humanos e dos chamados animais de sangue quente (aves e mamíferos), sendo as linhagens pertencentes às outras subespécies e à espécie *bongori* responsáveis por somente 1 a 2% dos isolados de *Salmonella* (NATARO et al., 2007).

As sorovariedades de *S. enterica* subesp. *enterica* são usualmente divididas em três grupos baseados nos hospedeiros a que infectam; são eles o grupo das sorovariedades hospedeiro-restritas, o das hospedeiro-adaptadas e o das ubiquitárias (não restritas) (UZZAU et al., 2000).

As sorovariedades hospedeiro-restritas são aquelas que são exclusivamente associadas a uma espécie particular de hospedeiro. Por exemplo, temos as sorovariedades Typhi, Abortusequi, Gallinarum, Typhisuis e Abortusovis que infectam humanos, equinos, frangos, suínos e ovinos respectivamente (UZZAU et al., 2000).

As sorovariedades hospedeiro-adaptadas causam doença em mais de uma espécie hospedeira, como por exemplo, as sorovariedades Dublin e Choleraesuis que causam doença sistêmica severa em gado e em porcos respectivamente, porém, esporadicamente causam doença em outros mamíferos incluindo humanos.

As sorovariedades ubiquitárias ou não restritas, apesar de poderem causar doença sistêmica em uma grande variedade de hospedeiros animais, usualmente causam uma gastroenterite auto-limitante em espécies hospedeiras não relacionadas. Como exemplo temos as sorovariedades Typhimurium e Enteritidis (UZZAU et al., 2000).

Entre as sorovariedades mais importantes como causadoras de doenças em humanos, podemos destacar as sorovariedades Typhi, Paratyphi, Enteritidis e Typhimurium (COBURN; GRASSL; FINLAY, 2007).

As sorovariedades Typhi e Paratyphi causam as chamadas febres entéricas ou febre tifóide, que se caracterizam por infecção sistêmica, febre e geralmente sintomas gastrointestinais como diarreia. Já as sorovariedades Enteritidis e

Typhimurium causam, sobretudo, enterocolite em humanos após 6 a 72 horas após a ingestão da bactéria, levando a sintomas como dor abdominal, diarreia com ou sem sangue, náuseas e vômitos (GRASSL; FINLAY, 2008).

1.4 - *Salmonella enterica* subesp. *enterica* sorovar. Enteritidis (S. Enteritidis)

Entre as sorovariedades de *Salmonella*, a sorovariedade Enteritidis compreende linhagens que tem seu nicho biológico relacionado a ovos. Isso porque possuem características que permitem uma interação específica com órgãos reprodutores de galinhas, bem como, com componentes do próprio ovo (GANTOIS et al., 2009).

Essa interação com animais diretamente relacionados à alimentação humana, fez com que a partir de meados dos anos 80, *S. Enteritidis* causasse uma pandemia contínua de infecções em quase todas as regiões do mundo através do consumo de frangos e ovos crus ou insuficientemente cozidos, tornando-se dessa forma a mais comum das sorovariedades de *Salmonella* spp. causadora de doenças em humanos (HUMPHREY, 2004; GANTOIS et al., 2009).

A proporção de isolados de *S. Enteritidis* a partir de então, aumentou em vários países do mundo, passando, por exemplo, de 6% para 25% nos Estados Unidos (OLSEN et al., 2001) e de 9% para 64% na Inglaterra (ROBERTS; SOCKETT, 1994). Na América Latina, seguindo o aumento mundial, verificou-se mais de 150 surtos de *S. Enteritidis* na Argentina entre 1986 e 1993 (CAFFER; EIGUER, 1994). No Chile o número de isolados passou de 13 por ano até 1993 para 478 só no ano de 1994 (FICA et al., 1997).

No Brasil, a primeira descrição de surto por *S. Enteritidis* foi feita por Mota e colaboradores em 1983 (MOTA et al., 1983), entretanto essa sorovariedade correspondia a menos de 1% dos isolados de *Salmonella* e praticamente não era isolada de fontes não humanas. A partir de 1991, o isolamento dessa sorovariedade começou a se tornar mais frequente, passando em 1994 a ser a sorovariedade mais isoladas tanto de fontes humanas como não humanas e chegando a 64,9% dos isolados de humanos em 1995 (Tabela 3) (TAUNAY et al., 1996; BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001; DOS SANTOS et al., 2003; FERNANDES et al., 2003).

Dados recentes mostram que *S. Enteritidis* continua a ser a sorovariedade mais frequentemente isolada em países da África, Ásia, Europa e América Latina e a

segunda mais isolada em países da América do Norte e Oceania, representado 43,5% dos isolamentos de *Salmonella* no mundo (HENDRIKSEN et al., 2011).

Segundo dados publicados em 2008 pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, *S. Enteritidis* foi responsável por 119 surtos alimentares registrados no Brasil entre 1999 e 2008. Além disso, outros 1275 surtos alimentares foram causados por *Salmonella* spp. sem identificação da sorovariedade. Em uma atualização desse boletim publicada em 2011 pela mesma secretaria, *Salmonella* spp. foi responsável por 1660 surtos alimentares, porém nesse boletim não foram apresentados os dados de *S. Enteritidis* separadamente (Figura 1), o que demonstra que a prevalência desse micro-organismo é subestimada no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A data precisa do início da pandemia de *S. Enteritidis* e suas razões não são bem estabelecidas. Entretanto acredita-se que possa ter se iniciado a partir do intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa. Também não é claro o porquê de linhagens de determinados fagotipos predominarem em diferentes partes do mundo (HUMPHREY, 2004).

Tabela 3 - Porcentagem de isolamento de diferentes sorovariedades de *Salmonella* isoladas entre 1970 e 2005 no Estado de São Paulo, Brasil

Sorovariedades de <i>Salmonella</i>	Fontes humanas (%)			Fontes não-humanas (%)			Sorovariedades de <i>Salmonella</i>	Fontes humanas (%)							Fontes não-humanas (%)					
	*1970-76	1977-82	1983-90	*1970-76	1977-82	1983-90		*91	92	93	94	95	Total	*91	92	93	94	95	Total	
Anatum				14,1	8,4		Enteritidis	1,2	2,0	10,1	43,3	64,9	668	0	0	1,8	22,0	40,7	546	
Typhimurium	77,7	69,3	36,0	24,5	10,6		I 4,[5],12:i:-	10,9	18,0	20,8	11,3	4,6	280	0	0	0	0	0	0	
Derby					9,5		Typhimurium	11,1	13,1	11,0	7,8	4,8	200	9,9	5,0	5,8	4,4	2,1	151	
Agona		16,1	21,3	10,8	14,2	5,7	Agona	16,0	12,5	8,5	3,6	3,5	185	6,4	3,7	3,6	4,4	1,2	115	
Infantis				7,0	14,3	9,6	Infantis	17,2	3,6	2,8	4,4	2,8	144	2,9	7,6	1,0	4,9	4,0	120	
Havana						8,3	Hadar	6,6	5,6	11,6	1,9	0,8	102	2,6	7,4	2,5	2,7	3,6	116	
Cerro						7,3	Outras sorovariedades	37,0	45,2	35,1	27,7	18,5		78,2	76,3	85,3	61,6	48,4		
Livingstone						7,1														
Enteritidis	0,37	0,85					Total	488	305	327	524	610	2254	312	462	916	528	1018	3236	
Outras sorovariedades	22,2	14,6	42,7	33,0	43,0	62,0														
Total	6551	15892	6215	1687	9130	3528														

* Ano de isolamento

Adaptada de Taunay *et al.* (1996)

Figura 1- Principais agentes etiológicos envolvidos em surtos alimentares no Brasil no período de 2000 a 2011 (Fonte: Secretaria de Vigilância Epidemiológica – Ministério da Saúde, 2013).

1.4.1 – Mecanismos de contaminação de ovos por *S. Enteritidis*

Em geral, existem duas possíveis rotas de contaminação de ovos por *S. Enteritidis*, a chamada transmissão horizontal e a transmissão vertical (GANTOIS et al., 2009).

Na transmissão horizontal, os ovos podem ser contaminados através da penetração pela casca do ovo, da bactéria que se encontra no intestino ou nas fezes da galinha, podendo ocorrer antes ou após a ovoposição (GANTOIS et al., 2009).

Após a ovoposição, qualquer ambiente contaminado ao redor, como o ninho ou a incubadora, podem servir como fonte de contaminação para o ovo. A presença de fezes da galinha e outros materiais orgânicos facilitam a sobrevivência e a multiplicação de *S. Enteritidis* na casca do ovo, entretanto, mesmo na ausência destes as linhagens dessa sorovariedade podem sobreviver e se multiplicar. A penetração da casca do ovo, bem como, das membranas internas não é característica exclusiva de *S. Enteritidis*, entretanto, essa sorovariedade possui mecanismos que permitem sua sobrevivência e crescimento nos componentes internos do ovo (GANTOIS et al., 2009).

A segunda rota de contaminação, a vertical, ocorre através da contaminação direta da gema, clara, membranas da casca ou da própria casca antes da ovoposição, originando-se da infecção dos órgãos reprodutivos por *S. Enteritidis*, muitas vezes sem que ocorra a infecção intestinal da galinha. Pouco se sabe até agora a respeito do local exato onde a bactéria se localiza nos tecidos reprodutivos da galinha, bem como quais fatores da bactéria e do hospedeiro estão envolvidos nessa interação. Entretanto, sabe-se que as linhagens dessa sorovariedade são capazes de subverter a resposta imune inata e adaptativa desse hospedeiro, indicando a sua capacidade de residir intracelularmente e escapar dos mecanismos de defesa (GANTOIS et al., 2009).

1.4.2 – Patogênese e manifestações clínicas

A infecção por *Salmonella* Enteritidis inicia-se com a ingestão de água ou alimentos contaminados, principalmente frangos e ovos crus ou mal cozidos. Após a ingestão, o micro-organismo precisa passar pelo ambiente ácido do estômago, muco intestinal e competir com a microbiota normal do hospedeiro (UZZAU et al., 2000).

Uma vez que ocorra a colonização do intestino, esses micro-organismos que são patógenos intracelulares facultativos apresentam a capacidade de aderir e invadir células da mucosa intestinal, preferencialmente as células M (JONES; GHORI; FALKOW, 1994; VELGE et al., 2012). Para isso, a bactéria transloca proteínas efetoras bacterianas no citosol da célula hospedeira através do chamado sistema de secreção do tipo III. Algumas dessas proteínas alteram a via de sinalização da célula hospedeira que promove alterações no citoesqueleto com consequente internalização da bactéria e mudanças na expressão de genes do hospedeiro (SANTOS et al., 2003).

Como consequência, essas proteínas desencadeiam respostas que aumentam a expressão de fatores quimioestáticos, estimulando a infiltração de neutrófilos na lâmina própria. Uma hora após a infecção, a bactéria chega à porção basal do epitélio e sofre fagocitose por neutrófilos e macrófagos, podendo ocorrer morte de macrófagos pelo micro-organismo, o que pode aumentar a reação inflamatória (SANTOS et al., 2003).

Com o progresso da reação inflamatória, os neutrófilos migram através da camada epitelial, com acúmulo de células inflamatórias e fluido proteico no lúmen intestinal. A grande reação inflamatória resulta em migração massiva de neutrófilos

através do epitélio, levando ao destacamento do epitélio da membrana basal, favorecendo a secreção de fluidos no lúmen intestinal e diarreia (SANTOS et al., 2003).

Devido à liberação de proteases e outros mediadores de células inflamatórias, pode ocorrer uma necrose extensiva da mucosa superficial após 24 a 48 horas do início da infecção (SANTOS et al., 2003).

A gastroenterite ou enterocolite é a manifestação clínica mais frequente da salmonelose. Outros sintomas clínicos da doença incluem dor abdominal, mialgia, náuseas, febre e vômito. A doença é geralmente auto-limitante e sua duração varia de quatro a dez dias (COBURN; GRASSL; FINLAY, 2007). Entretanto, a infecção pode evoluir para uma forma mais grave, uma vez que ultrapassada a mucosa intestinal, *S. enterica* é capaz de invadir, persistir e proliferar no interior de vacúolos de células do sistema retículo endotelial, podendo alcançar diferentes órgãos e tecidos do hospedeiro e causar infecção sistêmica (SALYERS; WHITT, 2002).

1.4.3 – Genes de virulência

Os genes de virulência de *Salmonella* estão presentes tanto em plasmídios quanto no cromossomo, podendo neste se apresentarem como unidades, em pequenos arranjos ou em grandes cassetes compostos de uma série de *operons*, as chamadas ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (IPS) (MARCUS et al., 2000).

As ilhas de patogenicidade são elementos genéticos integrados ao genoma base da bactéria que confere a esta um fenótipo de virulência. Atualmente, são conhecidas 21 Ilhas de patogenicidade diferentes em *Salmonella*. Entretanto, muitos dos genes identificados nessas ilhas não têm o seu papel identificado na patogênese desse gênero (BLONDEL et al., 2010; VELGE et al., 2012).

A ilha de patogenicidade 1, ou IPS-1, é uma ilha cromossomal de 40-kb que carrega, entre outros, todos os genes do sistema de secreção do tipo 3 (SST3), um complexo proteico capaz de injetar proteínas efetoras diretamente do citoplasma bacteriano até o citosol de células não-fagocíticas do hospedeiro. Essas proteínas modulam os processos celulares em benefício do patógeno, permitindo a entrada deste em vários tipos de células eucarióticas. Fazem parte dessa ilha os genes *inv*, *sip* e *sop* entre outros (VELGE et al., 2012).

Entre os componentes do SST3 da IPS-1, InvA, codificada pelo gene *invA*, é um membro de um conjunto de várias proteínas de membrana interna que formam o

SST3. Essa proteína é altamente conservada e é crítica para o funcionamento do SST3, entretanto, não se sabe ao certo o seu papel e como funciona nesse sistema (LILIC; QUEZADA; STEBBINS, 2010).

As proteínas Sip, entre elas SipA e SipD, são proteínas essenciais para a invasão intestinal, facilitando a internalização da bactéria. Além disso, essas proteínas atuam na translocação de proteínas efetoras (WALLIS; GALYOV, 2000).

Várias proteínas efetoras translocadas têm sido identificadas em *Salmonella* entre as quais estão as proteínas Sop (*Salmonella* Outer Proteins) (WALLIS; GALYOV, 2000). Entre as principais proteínas Sop, temos a SopA, SopB, SopD e SopE que, entre outras funções, participam da invasão celular atuando na membrana da célula hospedeira, bem como, contribuindo para o remodelamento de actina nessas células. Além disso, algumas dessas proteínas medeiam a secreção de fluidos e a inflamação (SANTOS et al., 2003; BAKOWSKI et al., 2007; AGBOR; MCCORMICK, 2011).

A ilha de patogenicidade 2 ou IPS-2 é composta por mais de 40 genes e contém genes importantes na virulência do microrganismo. Essa ilha possui outro SST3 que é ativado intracelularmente e é essencial para a replicação da bactéria dentro da célula hospedeira, incluindo células fagocíticas como os macrófagos (MARCUS et al., 2000; FIGUEIRA et al., 2013). A replicação intracelular da bactéria ocorre dentro de um compartimento, ligado a membrana, chamado *Salmonella-containing vacuole* (SCV). Proteínas efetoras são transportadas através da membrana do vacúolo, pelo SST3 da IPS-2, dentro do sistema endomembrana e citoplasma da célula hospedeira (HÖLZER; HENSEL, 2012; FIGUEIRA et al., 2013).

Até o momento foram reportadas 32 proteínas efetoras que são translocadas pelo SST3 da IPS-2, entretanto, pouco se sabe a respeito dessas proteínas e poucas foram confirmadas de estarem diretamente envolvidas na replicação intracelular da bactéria. Entre essas proteínas, a SsaR está envolvida no sistema estrutural do SST3 da IPS-2 e a proteína SifA participa da dinâmica do SCV, bem como está envolvida no crescimento bacteriano (FOREST et al., 2010; FIGUEIRA et al., 2013).

Outras características como a produção de flagelos, conferem à *Salmonella* uma vantagem competitiva por permitir sua movimentação através do meio em que se encontra. Os flagelos são codificados por genes cromossômicos como o *flgK*, *fljB* e o *flgL* (WOZNIAK; CHEVANCE; HUGHES, 2010; SHAH et al., 2011b).

Além dos genes cromossomais, algumas sorovariedades de *Salmonella* possuem plasmídios sorovariedade-específicos, os chamados *Salmonella plasmid virulence* (spv), que geralmente variam de 50 a 100 kb de tamanho. Esses plasmídios tipicamente possuem em comum os genes *spvRABCD*, que contribuem para a fase sistêmica de infecção por *Salmonella* (RYCHLIK; GREGOROVA; HRADECKA, 2006).

No caso de *S. Enteritidis*, o *pSEV* (*plasmid for S. Enteritidis virulence*) além dos genes citados acima entre outros, possui o gene chamado *prot6E*, que codifica a produção de uma fímbria de superfície única que altera sua interação com componentes do ovo. Isso confere a *S. Enteritidis* uma vantagem com relação às outras sorovariedades permitindo sua sobrevivência aos efeitos bactericidas do ovo (CLAVIJO et al., 2006).

1.4.4 – Resistência a antimicrobianos

Usualmente a gastroenterite causada por *Salmonella* é auto-limitante e não requer uso de antimicrobianos. Entretanto, em alguns casos a infecção pode evoluir para quadros mais graves e nesses casos o uso de antibióticos pode ser necessário (ALCAINE; WARNICK; WIEDMANN, 2007; PARRY; THRELFALL, 2008; NĂȘCUȚIU, 2012).

A resistência a determinado antibiótico implica a não eficácia da droga no tratamento da doença clínica causada pelo patógeno. Em *Salmonella*, a resistência a várias classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos, betalactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, trimetoprima, quinolonas e fluoroquinolonas têm sido reportada (ALCAINE; WARNICK; WIEDMANN, 2007; PARRY; THRELFALL, 2008; CAMPIONI; ZOLDAN; FALCÃO, 2013 - enviado para publicação).

Especificamente, o uso extensivo de fluoroquinolonas como a ciprofloxacina, a droga de escolha para tratamento clínico de humanos e o uso de quinolonas, como o ácido nalidíxico, utilizado na área veterinária no tratamento de infecções, têm levado ao surgimento de linhagens resistentes a quinolonas e com susceptibilidade reduzida a fluoroquinolonas (ANGULO et al., 2000; CHOI et al., 2005; BERTRAND et al., 2006; LEE et al., 2009; JEONG et al., 2011; TAMANG et al., 2011). Esse fato tem levado a falhas no tratamento das infecções por *Salmonella* com esses antibióticos (MØLBAK et al., 1999; HELMS et al., 2002).

As quinolonas têm como alvo a DNA girase da bactéria, uma enzima membro da classe das topoisomerases tipo II que é essencial na replicação do DNA bacteriano. A principal função da DNA girase é afrouxar o superenovelamento do DNA, necessário para o início da síntese do mesmo (STRAHILEVITZ et al., 2009). Essa enzima é composta de duas subunidades A codificadas pelo gene *gyrA* e duas subunidades B codificadas pelo gene *gyrB* (WOLFSON; HOOPER, 1989). O segundo alvo do antimicrobiano é a topoisomerase IV (NĂȘCUȚIU, 2012).

A ação das quinolonas está relacionada a ligação desse antimicrobiano a locais específicos da topoisomerase II, inibindo a síntese do DNA bacteriano (WOLFSON; HOOPER, 1989).

Os mecanismos ligados à resistência a quinolonas em *Salmonella*, incluem alteração do sítio de ligação do antibiótico na enzima, relacionado a mutações na chamada *quinolone-resistance-determining-region* (QRDR) dos genes alvo *gyrA* e *gyrB* que codificam a DNA girase e *parC* e *parE* que codificam a topoisomerase IV (NĂȘCUȚIU, 2012).

Usualmente, um único ponto de mutação na QRDR do gene *gyrA* resulta em resistência ao ácido nalidíxico. A QRDR da DNA girase A de *Salmonella enterica*, é localizada entre os aminoácidos 67 e 122 codificados pelos nucleotídeos 185 a 361. As substituições mais comuns de aminoácidos na subunidade A da DNA girase ocorre nos aminoácidos serina 83 e ácido aspártico 87 (KILMARTIN et al., 2005; GOVINDEN et al., 2009).

Mecanismos adicionais incluem a ação de bombas de efluxo que não permitem o acúmulo intracelular do antimicrobiano e também à ação dos genes plasmidiais *qnr* que codificam um grupo de proteínas pentapeptídicas que se ligam à DNA girase impedindo a ação das quinolonas (STRAHILEVITZ et al., 2009; JEONG et al., 2011; NĂȘCUȚIU, 2012).

1.4.5 – Métodos de tipagem de *Salmonella* Enteritidis

Os conhecimentos sobre a epidemiologia de *S. Enteritidis* advêm das investigações de surtos e casos esporádicos em que foi demonstrado que a maioria das infecções humanas é resultante da ingestão de alimentos de origem animal contaminados com o patógeno (MISHU et al., 1994; ALTEKRUSE; COHEN; SWERDLOW, 1997; OLSEN et al., 2001).

Devido à marcante importância de *Salmonella* Enteritidis como causa de doença veiculada por alimentos, várias metodologias de tipagem fenotípicas e genotípicas foram desenvolvidas e utilizadas com o intuito de se descobrir nos surtos de salmonelose as suas fontes de contaminação e para delinear-se a epidemiologia das infecções causadas por esse patógeno (THRELFALL; FROST, 1990; HICKMAN-BRENNER; STUBBS; FARMER, 1991; STUBBS et al., 1994; KOTETISHVILI et al., 2002; NATARO et al., 2007).

Entre os métodos fenotípicos clássicos utilizados na tipagem de linhagens de *Salmonella*, estão a biotipagem, a sorotipagem, a fagotipagem e a susceptibilidade a antimicrobianos. A sorotipagem baseada na identificação de antígenos somáticos (O) e flagelares (H de fase 1 e 2) é uma das metodologias mais comumente utilizadas na caracterização de linhagens de *Salmonella* (NATARO et al., 2007). Entretanto, os genes que codificam os antígenos O e a flagelina de fase I (HI) demonstraram ser extremamente variáveis e altamente propícios a recombinações, fato que explica a identificação de mais de 2500 sorovariedades diferentes de *Salmonella* até o momento (REEVES, 1993; LI et al., 1994).

A enorme quantidade de sorotipos existentes, agregados ao fato de alguns desses darem reações sorológicas cruzadas com *Escherichia coli* e bactérias de outros gêneros e, ao fato da necessidade de soros adsorvidos específicos para a sorologia, limitam a utilização desse ensaio. Outras técnicas fenotípicas como a fagotipagem, a biotipagem e o teste de susceptibilidade a antimicrobianos, têm sido usados na tipagem de *Salmonella* (HICKMAN-BRENNER; STUBBS; FARMER, 1991; STUBBS et al., 1994).

Entretanto, esses métodos convencionais são muitas vezes limitados por sua baixa capacidade de diferenciação de subtipos dentro de uma determinada espécie e também devido a problemas referentes à reprodutibilidade (OLIVE; BEAN, 1999). Alguns desses ensaios falham em discriminar linhagens de *Salmonella* relacionadas daquelas não relacionadas epidemiologicamente (THRELFALL; FROST, 1990; BORREGO et al., 1992; CHMIELEWSKI et al., 2002).

Nas últimas décadas, vários métodos genotípicos têm sido utilizados em substituição aos fenotípicos, o que tem minimizado problemas de reprodutibilidade e de baixa capacidade de discriminação de linhagens bacterianas observados nos métodos clássicos (KOTETISHVILI et al., 2002).

Tais estudos de investigação epidemiológica molecular possibilitam determinar qual a fonte e os veículos de transmissão, bem como, informam se os microrganismos envolvidos nos surtos representam ou não um único clone, entre outras informações. Somente quando essas informações são obtidas é possível realizar-se medidas eficientes de prevenção e controle de surtos (HELMUTH; SCHROETER, 1994; OLIVE; BEAN, 1999).

Os métodos moleculares mais utilizados para a tipagem de *Salmonella* Enteritidis têm sido *Amplified fragment length polymorphism* (AFLP), ribotipagem, *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE), *Enterobacterial repetitive intergenic consensus* - PCR (ERIC-PCR); *Multiple-locus variable-number tandem repeats analysis* (MLVA) e *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (MILLEMANN et al., 1996; RIDLEY; THRELFALL; ROWE, 1998; OLIVE; BEAN, 1999; CHMIELEWSKI et al., 2002; FERNANDES et al., 2003; TORPDAHL et al., 2005; SUH; SONG, 2006; AKTAS et al., 2007; ROMANI et al., 2007; CAO et al., 2008; MALORNY; JUNKER; HELMUTH, 2008; BERANEK et al., 2009; RIVOAL et al., 2009; ROSS; HEUZENROEDER, 2009; KILIC et al., 2010; PARKER et al., 2010; SHAH et al., 2011a; SHAH et al., 2011b; CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012; CAMPIONI et al., 2013).

1.4.5.1 – *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* - PCR (ERIC-PCR)

A família de elementos repetitivos chamada *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC) também conhecida como *Intergenic Repeat Units* (IRUs), é um palíndromo imperfeito de 127 pb que ocorre em múltiplas cópias no genoma de bactérias entéricas e víbrios (Versalovic, Koeuth e Lupski, 1991; Wilson e Sharp, 2006). Esses elementos ERIC contêm uma região central altamente conservada e localizada em regiões intergênicas não codificantes do genoma bacteriano, ou seja, situam-se entre genes transcritos dentro ou fora de *operons*, com sua posição variando em relação à posição das sequências de terminação e promotora de genes, fazendo com que apenas uma pequena parte destas sequências ERIC seja transcrita na forma de mRNA (SHARPLES; LLOYD, 1990; VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

Sequências ERIC têm sido usadas como base para uma técnica de tipagem bacteriana denominada ERIC-PCR. Essa metodologia utiliza uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* consenso para amplificar regiões entre

sequencias ERIC do genoma bacteriano (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; WILSON; SHARP, 2006).

Essas análises por PCR revelam distâncias inter-ERIC e padrões de bandas específicos para as espécies bacterianas. Dependendo da distância entre duas dessas sequencias adjacentes, a porção de DNA compreendida entre elas será amplificada pela PCR. Se a posição das sequencias ERIC varia entre diferentes linhagens, os produtos de amplificação caracterizam um perfil específico de cada linhagem e serão visualizados como bandas de diferentes tamanhos em um gel de agarose (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991; LUPSKI; WEINSTOCK, 1992; WILSON; SHARP, 2006).

Como diferentes linhagens bacterianas apresentam polimorfismo quanto ao número e posição dessas sequencias, esse padrão de bandas resultante da PCR é utilizado para diferenciá-las. A comparação entre os perfis eletroforéticos de diferentes linhagens pode, portanto, ser utilizado para determinar o grau de similaridade entre as linhagens testadas. Considerando que o perfil de bandas gerado através desta reação é reprodutível e que uma mesma linhagem bacteriana, testada repetidas vezes apresenta sempre o mesmo padrão, pode-se dizer que esse método de tipagem é eficiente e que o padrão de bandas obtido é específico para cada linhagem (LUPSKI; WEINSTOCK, 1992).

A utilização da técnica de ERIC-PCR para tipagem de *Salmonella* Enteritidis é pouco relatada, entretanto alguns estudos têm demonstrado que essa metodologia é rápida e eficiente na discriminação de linhagens dessa sorovariedade (CHMIELEWSKI et al., 2002; AMMARI et al., 2009; CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

1.4.5.2 – Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

O cromossomo é um componente fundamental de identidade da célula bacteriana e, portanto, representa um meio para verificar o inter-relacionamento de linhagens. Um modo de verificar esse inter-relacionamento é clivar o DNA cromossômico com enzimas de restrição, resultando em uma série de fragmentos de diferentes tamanhos que formam diferentes perfis de bandas quando resolvidos por eletroforese em gel de agarose (MAGALHÃES et al., 2005; SINGH et al., 2006).

Enzimas de restrição que clivam o DNA em sítios menos frequentes, geram fragmentos muito grandes, acima de 50 kb, para serem analisados por uma

eletroforese convencional (MAGALHÃES et al., 2005; SINGH et al., 2006). Para solucionar esse problema, um método alternativo chamado *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) ou eletroforese em campo pulsado foi desenvolvido por Schwartz e Cantor para a separação dessas bandas (SCHWARTZ; CANTOR, 1984).

Essa técnica, que originalmente foi desenvolvida para separar os cromossomos de *Saccharomyces cerevisiae*, permite a separação de fragmentos de DNA maiores que 10 kb, pois ao invés de aplicar a corrente elétrica em uma única direção do gel, como é feito na eletroforese convencional, a corrente é aplicada em diferentes ângulos pré-determinados por curtos períodos de tempo (pulsos), através de grupos de eletrodos (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997). Quando ocorre a troca na direção do campo elétrico, as moléculas de DNA são reposicionadas de forma paralela ao campo de força antes de migrarem para o pólo positivo. Os fragmentos menores se reorientam mais facilmente que os maiores que levam mais tempo para se adaptarem à nova direção (MAGALHÃES et al., 2005).

Diferentes métodos de PFGE foram desenvolvidos ao longo do tempo, incluindo métodos que alternam campos elétricos transversais entre os quais o *countor-clamped homogeneous electric field* (CHEF) é o mais utilizado e também os que utilizam alternância de campos elétricos invertidos como o *field-inversion gel electrophoresis* (FIGE) (MAGALHÃES et al., 2005).

A análise dos padrões de bandas das diferentes linhagens é realizada por *softwares* especializados que comparam as linhagens estabelecendo a similaridade genômica entre elas (SINGH et al., 2006).

A metodologia de PFGE foi proposta como “padrão-ouro” para tipagem de linhagens de *Salmonella*, apresentando bom poder discriminatório e fornecendo bons dados para estudos epidemiológicos (TENOVER et al., 1995; RIDLEY; THRELFALL; ROWE, 1998; BENDER et al., 2001; AKTAS et al., 2007; RIVOAL et al., 2009; PARKER et al., 2010; YANG et al., 2010; ZHENG et al., 2011; CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012; ZOU; KEELARA; THAKUR, 2012; SON et al., 2013).

1.4.5.3 – Multilocus sequence typing (MLST)

A metodologia de MLST foi proposta por Maiden e colaboradores como uma metodologia capaz de superar os problemas de reprodutibilidade inter-laboratoriais enfrentados nas metodologias de tipagem tradicionais (MAIDEN et al., 1998).

Essa metodologia se baseia no sequenciamento de alguns genes essenciais ou de manutenção, os chamados genes *housekeeping*. Após o sequenciamento, as sequências são depositadas em um banco de dados *online*, sendo cada sequência correspondente a um alelo. Sequências diferentes são consideradas alelos diferentes daquele gene e recebem arbitrariamente um número para identificação daquele alelo (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

O conjunto de alelos de cada amostra bacteriana dá origem ao *sequence typing* (ST) que é utilizado para análises filogenéticas, populacionais e evolucionárias de patógenos bacterianos (MAIDEN et al., 1998; URWIN; MAIDEN, 2003).

MLST tem as vantagens de ser altamente reprodutivo e menos sujeito a erros humanos em comparação a outras metodologias, além da grande vantagem de seus resultados poderem ser disponibilizados em bancos de dados específicos e compartilhados *online*, o que possibilita a análise comparativa da diversidade genética de bactérias isoladas em diferentes partes do mundo (MAIDEN et al., 1998).

Alguns estudos foram realizados onde MLST foi utilizado para análises filogenéticas de *Salmonella enterica* (KOTETISHVILI et al., 2002; FAKHR; NOLAN; LOGUE, 2005; TORPDAHL et al., 2005; ALCALINE; WARNICK; WIEDMANN, 2007; TANKOUO-SANDJONG et al., 2007; NODA et al., 2011; ACHTMAN et al., 2012). Entretanto, somente um trabalho foi realizado especificamente com linhagens de *S. Enteritidis* (NODA et al., 2011).

1.4.5.4 – *Multilocus variable-number tandem-repeat analysis* (MLVA)

O sequenciamento de genomas tanto de procariotos quanto de eucariotos, revelou uma alta porcentagem do DNA que consiste de repetições. Essas repetições variam em tamanho, local, complexidade e maneira como ocorrem (LINDSTEDT, 2005).

Muitas regiões do genoma bacteriano contêm esses *loci* de DNA repetitivo que podem variar de uma linhagem a outra quanto ao número de unidades repetitivas. Por isso, essas regiões são chamadas de *variable number of tandem repeat regions* (VNTRs) (VAN BELKUM, 2007).

Acredita-se que essa variação nas repetições ocorra, pois ao fazer a cópia de trechos com unidades repetitivas, a DNA polimerase pode realizar erros de

pareamento, inserindo ou excluindo unidades repetitivas individuais. A frequência desse fato vai variar de acordo com a eficácia do sistema de reparo do organismo em questão (VAN BELKUM, 2007).

Baseado nas variações dessas sequências repetitivas, várias metodologias de tipagem bacteriana têm sido desenvolvidas. A metodologia de *Multilocus variable-number tandem-repeat (VNTR) analysis* (MLVA), desenvolvida por Van Belkum, baseia-se na quantificação de pequenas sequências repetitivas, em diferentes *loci* do genoma bacteriano (VAN BELKUM *et al.*, 1997; VAN BELKUM, 2007).

Essa metodologia utiliza uma PCR convencional onde são amplificadas regiões que contêm sequências que se repetem em sequencialmente. O produto dessa PCR pode ser analisado tanto por uma eletroforese convencional quanto através de eletroforese capilar que permite determinar mais precisamente o tamanho dos fragmentos amplificados e, posteriormente o cálculo do número de repetições dentro de determinado *locus* (KRUY; VAN CUYCK; KOECK, 2011).

MLVA tem demonstrado grande eficiência na discriminação de linhagens de *S. Enteritis*, sendo reprodutível, rápida e com dados que são de fácil análise, demonstrando algumas vezes ser melhor do que a metodologia de PFGE (BOXRUD *et al.*, 2007; ROSS; HEUZENROEDER, 2009; HOPKINS *et al.*, 2011; SHAH *et al.*, 2011a; SHAH *et al.*, 2011b; CAMPIONI *et al.*, 2013).

1.4.5.5 – High-resolution melting analysis (HRMA)

High-resolution melting analysis (HRMA) é uma metodologia pós-PCR utilizada para identificação de variação genética em sequências de DNA (REED; KENT; WITTEWER, 2007). Essa metodologia compreende a análise de uma curva de dissociação de alta resolução de *amplicons* para a determinação precisa da relação entre temperatura e desnaturação da dupla fita de DNA. A técnica de HRMA é tipicamente realizada em um equipamento de *real-time* PCR associado a softwares específicos para análise de dissociação de alta resolução para determinação, entre outras coisas, de *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) (RUSKOVA; RACLAVSKY, 2011; TONG; GIFFARD, 2012).

A análise por HRM se inicia com a amplificação da região de interesse na presença de um agente intercalante de DNA dupla fita que apresenta elevada fluorescência quando ligado ao DNA e baixa fluorescência quando não ligado (RUSKOVA; RACLAVSKY, 2011).

A amplificação é seguida pela etapa de desnaturação térmica do produto da PCR, quando ocorre a liberação das moléculas do agente intercalante de DNA. A taxa de redução na fluorescência ocorre lentamente, porém quando a dupla fita de DNA está próximo a sua temperatura de *melting* característica, ocorre uma grande redução da fluorescência. A temperatura de *melting* é caracterizada como a temperatura na qual metade das duplas fitas de DNA encontra-se totalmente desnaturada (RUSKOVA; RACLAVSKY, 2011).

A curva de *melting* é determinada através dos dados de fluorescência registrados durante a dissociação do *amplicon* em função das temperaturas de dissociação geradas a partir do aquecimento da amostra (RUSKOVA; RACLAVSKY, 2011).

Fragmentos que possuem troca de bases de A-T para C-G ou vice-versa, são facilmente detectados pela mudança da temperatura de *melting* que gerará perfis diferentes. Quando essa mudança ocorre em bases complementares, A-T para T-A ou C-G para G-C, geralmente é necessário a inserção de uma sequência de DNA exógena para a formação de heteroduplexes (CHENG et al., 2011; TONG; GIFFARD, 2012).

1.5 – Relevância do estudo

Frente a grande importância de *Salmonella* Enteritidis como causadora de surtos de origem alimentar em todo o mundo, estudos sobre a epidemiologia, características de resistência e potencial patogênico de linhagens dessa sorovariedade isoladas de várias fontes são de grande importância para a elucidação de rotas de infecção, bem como, importantes na caracterização da diversidade genotípica que podem ocorrer em linhagens isoladas em diferentes locais do mundo.

No Brasil, praticamente, não existem estudos de tipagem de *Salmonella* Enteritidis em escala nacional sendo que a maioria dos estudos publicados foi realizada com linhagens isoladas das regiões Sudeste e Sul, em estudos nem sempre exclusivos dessa sorovariedade (HOFER; DOS REIS, 1994; IRINO et al., 1996; TAUNAY et al., 1996; TAVECHIO et al., 1996; DE CASTRO et al., 2002; TAVECHIO et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2003; FERNANDES et al., 2003; FERNANDES et al., 2006; VAZ et al., 2010).

Além disso, a grande maioria dos trabalhos com *Salmonella* Enteritidis do Brasil utilizou metodologias fenotípicas para a tipagem dos isolados dessa sorovariedade, sobretudo a sorotipagem e a fagotipagem, que apresentaram uma baixa capacidade de diferenciar as linhagens (HOFER; DOS REIS, 1994; IRINO et al., 1996; TAUNAY et al., 1996; PERESI et al., 1998; BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001; DE CASTRO et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2003; FERNANDES et al., 2003; GHILARDI; TAVECHIO; FERNANDES, 2006; OLIVEIRA et al., 2007; KOBER et al., 2011).

Em contrapartida, nos estudos publicados em que metodologias de tipagem molecular foram utilizadas, observou-se uma maior diferenciação de subtipos dentro de uma determinada sorovariedade, em comparação à fagotipagem e outros métodos fenotípicos (FERNANDES et al., 2003; MATSUOKA et al., 2004; KOBER et al., 2011; KOTTWITZ et al., 2011).

Dessa forma, estudos de tipagem molecular, bem como, a verificação do potencial patogênico e a susceptibilidade a antimicrobianos de linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de diversas fontes no Brasil são importantes para melhor caracterizar a diversidade das linhagens circulantes no país, sua capacidade de causar doença e de resistir a possíveis antimicrobianos utilizados para tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Investigar o potencial patogênico, a resistência a antimicrobianos e realizar a tipagem molecular de linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, de alimentos e de frangos no Brasil.

2.2. Objetivos específicos

- 1- Verificar o potencial patogênico das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, alimentos e frangos através da pesquisa dos genes de virulência *invA*, *sipA*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *ssaR*, *sifA*, *spvB*, *prot6E*, *flgK*, *fljB* e *flgL* presentes nas ilhas de patogenicidade IPS-1 e IPS-2 e no plasmídeo *pSEV*.
- 2- Verificar a susceptibilidade das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, alimentos e frangos frente aos antimicrobianos amicacina, tetraciclina, ampicilina, cefalotina, sulfametoxazol-trimetoprima, ácido nalidíxico, estreptomicina, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, norfloxacina e lomefloxacina.
- 3- Determinar os mecanismos de resistência a quinolonas e a concentração inibitória mínima frente à fluoroquinolona ciprofloxacina.
- 4- Analisar a diversidade genômica das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos e alimentos entre si por ERIC-PCR e PFGE, comparando os isolados de surtos com os de casos esporádicos, de origem alimentar e/ou humana.
- 5- Analisar a diversidade genômica das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de frangos entre si por ERIC-PCR e PFGE.
- 6- Verificar a diversidade genética das linhagens de *S. Enteritidis*, comparando-as com outras isoladas em diferentes locais do mundo por MLST.
- 7- Verificar a diversidade genômica das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, alimentos e frangos no Brasil, comparando-as com linhagens isoladas de humanos e de frangos na América do Norte por MLVA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Linhagens bacterianas

Foram estudadas 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis, sendo 67 linhagens de origem clínica humana, 61 de alimentos e 60 de frangos. As linhagens de frangos foram isoladas tanto de amostras clínicas de frangos (44) quanto do ambiente da granja (16).

As linhagens de humanos e alimentos fazem parte da coleção de cultura do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto (IAL) e foram isoladas a partir de material proveniente de várias cidades do Estado de São Paulo, por pesquisadores daquele instituto, entre 1986 e 2010 (Tabela 4).

As linhagens relacionadas a frangos foram isoladas pela AVIPA (Avicultura Integral e Patologia S/A – Campinas/SP) entre 2004 e 2010 e, são provenientes de amostras de vários Estados do Brasil (Tabela 4).

Tabela 4 – Características das 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de material clínico de humanos (67), de alimentos (61) e de frangos (60)

Linhagem	Origem	Material	Surto	Ano de isolamento	Local
SE 4 [†]	Humana	Fezes	-	1986	Ribeirão Preto/SP
SE 5 [†]	Humano	Fezes	-	1992	Jaboticabal/SP
SE 6	Humano	Fezes	-	1994	Pontal/SP
SE 7	Humano	Fezes	-	1994	Cajuru/SP
SE 8	Humano	Fezes	-	1994	-
SE 9	Humano	Fezes	-	1994	Monte Alto/SP
SE 10	Humano	Fezes	-	1994	Monte Alto/SP
SE 11 [†]	Humano	Fezes	Surto 1	1994	Ribeirão Preto/SP
SE 12	Alimentos	Salpicão com maionese caseira	Surto 2	1994	Taquaritinga/SP
SE 13 [†]	Alimentos	Linguiça de frango crua	-	1994	-
SE 15 [†]	Humano	Fezes	-	1995	Ribeirão Preto/SP
SE 16 [†]	Humano	Fezes	Surto 3	1995	Ribeirão Preto/SP
SE 17	Alimentos	Frango ensopado	Surto 3	1995	Araraquara/SP
SE 18	Alimentos	Maionese com legumes	Surto 3	1995	Araraquara/SP
SE 22	Humano	Fezes	-	1995	Ribeirão Preto/SP
SE 23	Humano	Fezes	-	1995	Ribeirão Preto/SP
SE 27	Alimentos	Linguiça crua	-	1995	-
SE 28	Alimentos	Maionese na bisnaga plástica	Surto 4	1995	Nova Europa/SP
SE 29	Alimentos	Frango congelado	-	1995	-
SE 30	Alimentos	Sanduíche	Surto 5	1995	Barretos/SP
SE 32	Alimentos	Milho verde cozido	Surto 5	1995	Barretos/SP
SE 33	Alimentos	Batata frita	Surto 5	1995	Barretos/SP
SE 35	Alimentos	Salada de maionese	Surto 5	1995	Barretos/SP
SE 36 [†]	Alimentos	Carcaça de frango resfriado	-	1995	-

Continua

Continuação

Linhagem	Origem	Material	Surto	Ano de isolamento	Local
SE 37	Alimentos	Maionese de legumes	Surto 6	1995	Franca/SP
SE 38	Alimentos	Salada de macarrão com maionese	Surto 6	1995	Franca/SP
SE 39	Alimentos	Ovos de codorna cozido	Surto 6	1995	Franca/SP
SE 41	Humano	Fezes	Surto 7	1996	Ribeirão Preto/SP
SE 43	Humano	Fezes	Surto 7	1996	Ribeirão Preto/SP
SE 48	Humano	Fezes	Surto 8	1996	Guaíra/SP
SE 50*	Humano	Fezes	Surto 8	1996	Guaíra/SP
SE 56	Alimentos	Lombo suíno cru	Surto 8	1996	Guaíra/SP
SE 59	Humano	Fezes	Surto 9	1996	Guaíra
SE 60 [†]	Alimentos	Pavê	Surto 9	1996	Batatais/SP
SE 66 [†]	Humano	Fezes	Surto 11	1996	Batatais/SP
SE 67	Alimentos	Bolo recheado	Surto 11	1996	Batatais/SP
SE 68	Humano	Fezes	-	1996	Jardinópolis/SP
SE 70 [†]	Humano	Fezes	-	1996	Ribeirão Preto
SE 73	Alimentos	Carne de frango	-	1996	-
SE 74	Alimentos	Carcaça de frango resfriado	-	1996	Ibitinga/SP
SE 75	Alimentos	Carcaça de frango resfriado	-	1996	Ibitinga/SP
SE 76	Alimentos	Almeirão	-	1996	Ribeirão Preto/SP
SE 77	Humano	Fezes	-	1996	Jardinópolis/SP
SE 80 [†]	Humano	Fezes	Surto 12	1997	Descalvado/SP
SE 84	Alimentos	Bolo	Surto 12	1997	Descalvado/SP
SE 85	Alimentos	Sanduíche com maionese caseira	Surto 13	1997	Matão/SP
SE 86 [†]	Alimentos	Maionese caseira	Surto 13	1997	Matão/SP
SE 87	Alimentos	Bolo	Surto 14	1997	Ribeirão Preto
SE 88 [†]	Alimentos	Maionese caseira	Surto 15	1997	Bebedouro/SP
SE 89	Humano	Fezes	Surto 16	1998	Boa Esperança do Sul/SP
SE 94 [†]	Humano	Fezes	-	1998	-
SE 96	Humano	Fezes	Surto 17	1998	Cajobi/SP
SE 100	Humano	Fezes	Surto 17	1998	Cajobi/SP
SE 114 [†]	Alimentos	Maionese caseira	Surto 17	1998	Cajobi/SP
SE 115	Alimentos	Mousse de chocolate	Surto 18	1998	Ribeirão Preto/SP
SE 116	Alimentos	Bolo	Surto 19	1998	Sertãozinho/SP
SE 117 [†]	Humano	Fezes	-	1999	Ribeirão Preto/SP
SE 119	Humano	Fezes	-	1999	Jardinópolis/SP
SE 120 [†]	Humano	Fezes	Surto 20	1999	Ribeirão Preto/SP
SE 124	Humano	Fezes	Surto 20	1999	Ribeirão Preto/SP
SE 125	Alimentos	Bolo	Surto 20	1999	Ribeirão Preto/SP
SE 126*	Alimentos	Maionese caseira	Surto 21	1999	Ribeirão Bonito/SP
SE 127*	Alimentos	Sanduíche	Surto 21	1999	Ribeirão Bonito/SP
SE 128	Alimentos	Bolo	Surto 22	1999	São Carlos/SP
SE 129	Alimentos	Bolo	Surto 23	1999	Jardinópolis/SP
SE 130	Alimentos	Frango assado	Surto 24	1999	Matão/SP
SE 131	Alimentos	Salsicha com molho de tomate	Surto 25	1999	Batatais/SP
SE 132	Alimentos	Sopa	Surto 25	1999	Batatais/SP
SE 133 [†]	Alimentos	Bolo	Surto 27	1999	Batatais/SP
SE 134	Alimentos	Bolo	Surto 27	1999	Luiz Antônio/SP

Continua

Continuação

Linhagem	Origem	Material	Surto	Ano de isolamento	Local
SE 135*	Alimentos	Frango cru	-	1999	Araraquara/SP
SE 136* [†]	Humano	Fezes	Surto 28	2000	Porto Ferreira/SP
SE 139*	Humano	Fezes	Surto 28	2000	Porto Ferreira/SP
SE 142*	Alimentos	Maionese caseira com legumes	Surto 28	2000	Porto Ferreira/SP
SE 143*	Humano	Fezes	-	2000	Porto Ferreira/SP
SE 144* [†]	Humano	Fezes	-	2000	Porto Ferreira/SP
SE 147 [†]	Alimentos	Maionese caseira	Surto 30	2000	Olímpia/SP
SE 150	Alimentos	Ovos	-	2000	Araraquara/SP
SE 151*	Humano	Fezes	-	2001	Ribeirão Preto/SP
SE 153	Humano	Fezes	-	2001	Ribeirão Preto/SP
SE 154	Humano	Fezes	Surto 31	2001	Ribeirão Preto/SP
SE 156 [†]	Humano	Fezes	Surto 32	2001	Ribeirão Preto/SP
SE 158	Humano	Fezes	Surto 32	2001	Ribeirão Preto/SP
SE 162	Alimentos	Maionese caseira	Surto 32	2001	Ribeirão Preto/SP
SE 164	Alimentos	Maionese caseira	Surto 32	2001	Ribeirão Preto/SP
SE 165	Alimentos	Sanduíche	Surto 33	2001	Pitangueiras/SP
SE 168* [†]	Alimentos	Maionese caseira	Surto 34	2001	Jaboticabal/SP
SE 171 [†]	Humano	Fezes	-	2002	Ribeirão Preto/SP
SE 173	Humano	Fezes	Surto 35	2002	Ribeirão Preto/SP
SE 181	Humano	Fezes	Surto 37	2002	Araraquara/SP
SE 183	Humano	Fezes	-	2002	Ribeirão Preto/SP
SE 185	Humano	Fezes	-	2002	Ribeirão Preto/SP
SE 186	Humano	Fezes	-	2002	Ribeirão Preto/SP
SE 187*	Humano	Fezes	Surto 38	2002	Dumont/SP
SE 191* [†]	Alimentos	Bolo	Surto 38	2002	Dumont/SP
SE 192	Alimentos	Sanduíche	-	2002	São Carlos/SP
SE 193	Humano	Fezes	-	2003	Ribeirão Preto/SP
SE 197 [†]	Humano	Fezes	Surto 39	2003	Franca/SP
SE 198*	Alimentos	Bolo	Surto 40	2003	Cajuru/SP
SE 199*	Alimentos	Carne suína	Surto 41	2003	Santa Rosa do Viterbo/SP
SE 200*	Alimentos	Mamão fatiado	Surto 41	2003	Santa Rosa do Viterbo/SP
SE 201 [†]	Alimentos	Pavê	Surto 42	2003	São Simão/SP
SE 206	Humano	Fezes	Surto 43	2004	Ribeirão Preto/SP
SE 211*	Humano	Fezes	Surto 44	2004	Franca/SP
SE 214* [†]	Humano	Fezes	-	2004	Barrinha/SP
SE 223*	Humano	Fezes	Surto 45	2004	Dourado/SP
SE 227*	Alimentos	Maionese caseira com legumes	Surto 45	2004	Dourado/SP
SE 230*	Alimentos	Merengue com morango	Surto 46	2004	Santa Rosa do Viterbo/SP
SE 231* [†]	Alimentos	Peixe in natura	-	2004	Ribeirão Preto/SP
SE 233*	Humano	Fezes	Surto 47	2004	São Carlos/SP
SE 234*	Humano	Fezes	Surto 47	2004	São Carlos/SP
SE 239 [†]	Humano	Fezes	Surto 48	2005	Araraquara/SP
SE 241 [†]	Alimentos	Bolo	Surto 48	2005	Araraquara/SP
SE 242	Alimentos	Bolo	Surto 48	2005	Araraquara/SP
SE 244 *	Humano	Fezes	-	2006	Ribeirão Preto/SP
SE 246* [†]	Humano	Fezes	Surto 49	2006	Batatais/SP
SE 247	Humano	Fezes	-	2006	São Joaquim da Barra/SP
SE 249*	Humano	Fezes	Surto 50	2006	Ribeirão Preto/SP
SE 251*	Humano	Fezes	Surto 51	2006	Brodowski/SP
SE 252 [†]	Alimentos	Rúcula	Surto 52	2007	Franca/SP

Continua

Continuação

Linhagem	Origem	Material	Surto	Ano de isolamento	Local
SE 253*	Humano	Fezes	-	2009	Franca/SP
SE 255*	Humano	Fezes	Surto 53	2009	Ribeirão Preto/SP
SE 260* [†]	Humano	Fezes	Surto 54	2009	Ribeirão Preto/SP
SE 263*	Humano	Fezes	Surto 55	2009	Ribeirão Preto/SP
SE 267*	Humano	Fezes	Surto 56	2009	Batatais/SP
SE 269* [†]	Alimentos	Bife rolê	Surto 57	2010	Araraquara/SP
SE 270 * [†]	Humano	Fezes	Surto 57	2010	Araraquara/SP
SE 273*	Humano	Fezes	Surto 57	2010	Araraquara/SP
SE 34/04*	Frangos - clínico	Mecônio	-	2004	MT
SE 55/04*	Frangos – ambiente	Swab de arrasto	-	2004	PE
SE 67/04*	Frangos – clínico	Mecônio	-	2004	PR
SE 69/04*	Frangos – clínico	Ovos bicados/órgãos	-	2004	PR
SE 294/04	Frangos – clínico	Ovos bicados/órgãos	-	2004	SE
SE 296/04	Frangos – clínico	Ovos bicados/ceco	-	2004	SE
SE 298/04	Frangos – clínico	Mecônio	-	2004	SE
SE 302/04	Frangos – clínico	Mecônio	-	2004	SE
SE 304/04	Frangos – clínico	Mecônio	-	2004	SE
SE 312/04	Frangos – ambiente	Swab de caixa	-	2004	SE
SE 67/05*	Frangos – clínico	Ovos bicados/ceco	-	2005	PE
SE 69/05	Frangos – clínico	Mecônio	-	2005	PE
SE 73/05*	Frangos – clínico	Ovos bicados/gema	-	2005	PE
SE 226/05 [†]	Frangos – clínico	Aves mortas	-	2005	SP
SE 275/05*	Frangos – clínico	Mecônio	-	2005	PE
SE 332/05* [†]	Frangos – clínico	Ave viva	-	2005	SP
SE 348/05*	Frangos – clínico	Ovos bicados/gema	-	2005	PE
SE 413/05*	Frangos – clínico	Aves mortas	-	2005	PR
SE 27/06*	Frangos – clínico	Ovos bicados/órgãos	-	2006	PE
SE 31/06	Frangos – clínico	Aves mortas	-	2006	PE
SE 88/06	Frangos – ambiente	Swab de arrasto	-	2006	SP
SE 98/06*	Frangos – ambiente	Swab propé	-	2006	SP
SE 102/06*	Frangos – clínico	Ovos bicados/gema	-	2006	PE
SE 110/06	Frangos – clínico	Ovos bicados/ceco	-	2006	PE

Continua

Continuação

Linhagem	Origem	Material	Surto	Ano de isolamento	Local
SE 112/06	Frangos – clínico	Ovos bicados/gema	-	2006	PE
SE 150/06*	Frangos – ambiente	Swab propé	-	2006	SP
SE 355/06 [†]	Frangos – clínico	Ovos bicados/gema	-	2006	SP
SE 387/06* [†]	Frangos – clínico	Mecônio	-	2006	SP
SE 131/07*	Frangos – clínico	Mecônio	-	2007	PE
SE 135/07*	Frangos – clínico	Ovos bicados/órgãos	-	2007	PE
SE 139/07* [†]	Frangos – clínico	Intestino	-	2007	SP
SE 143/07*	Frangos – ambiente	Swab de fundo de caixa	-	2007	PR
SE 189/07	Frangos – clínico	Ovos bicados/órgãos	-	2007	PE
SE 191/07*	Frangos – clínico	Órgãos resfriados/baço	-	2007	PR
SE 199/07*	Frangos – clínico	Ovos bicados/órgãos	-	2007	PR
SE 217/07	Frangos – clínico	Ovos bicados/órgãos	-	2007	PE
SE 255/07*	Frangos – clínico	Ovos bicados/gema	-	2007	SP
SE 05/08* [†]	Frangos – clínico	Ovos bicados/gema	-	2008	SP
SE 27/08*	Frangos – clínico	Ovos bicados/ceco	-	2008	PE
SE 129/08*	Frangos – clínico	Ovos bicados/órgãos	-	2008	SP
SE 133/08* [†]	Frangos – clínico	Mecônio	-	2008	SP
SE 203/08*	Frangos – clínico	Mecônio	-	2008	SP
SE 227/08*	Frangos – clínico	Mecônio	-	2008	SP
SE 257/08	Frangos – clínico	Swab de cloaca	-	2008	SP
SE 317/08*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2008	SP
SE 327/08*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2008	SP
SE 331/08*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2008	PE
SE 11/09*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2009	MG
SE 21/09*	Frangos - ambiente	Swab cloaca	-	2009	SP
SE 37/09*	Frangos – clínico	Mecônio	-	2009	PE
SE 107/09*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2009	PE
SE 113/09*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2009	SP

Continua

Conclusão					
Linhagem	Origem	Material	Surto	Ano de isolamento	Local
SE 141/09*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2009	SP
SE 165/09*†	Frangos – clínico	Mecônio	-	2009	SP
SE 217/09*	Frangos – clínico	Mecônio	-	2009	SP
SE 229/09*	Frangos – clínico	Ovos bicados/ceco	-	2009	SP
SE 179/10*†	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2010	SP
SE 191/10*†	Frangos – clínico	Ave viva	-	2010	PE
SE 197/10*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2010	SP
SE 219/10*	Frangos - ambiente	Swab propé	-	2010	SP

* - Linhagens resistentes ao ácido nalidíxico utilizadas no Item 3.8

† - Linhagens tipadas por MLST (Item 3.13).

3.2 - Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens de *Salmonella* Enteritidis

Todas as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis listadas na Tabela 4 foram inicialmente inoculadas em caldo BHI (Himedia) e incubadas a 37°C, por 18-24 horas. Após esse período foram semeadas em ágar MacConkey (Himedia), incubadas a 37°C, por 18-24 horas para isolamento de colônias e para observação da utilização ou não da lactose. Em seguida, as colônias características de *Salmonella* spp. foram inoculadas em meio de identificação presuntiva IAL (Pessoa e Da Silva, 1974) (Anexo I) e incubadas a 37°C por 18-24 horas.

A reativação e reconfirmação da pureza das 128 linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos e alimentos foi realizada no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, sob a coordenação da pesquisadora científica Alzira Maria Morato Bergamini, e a das 60 isoladas de frangos foi realizada na AVIPA, sob a coordenação da pesquisadora Mariana Mamede Zoldan.

Posteriormente, as linhagens com as características bioquímicas compatíveis com *Salmonella* spp. foram semeadas em frascos contendo BHI com 20% de glicerol e mantidas em freezer -80°C.

3.3 - Armazenamento das linhagens bacterianas

Após reconfirmação bioquímica e da pureza, as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas (Tabela 4), foram semeadas para estocagem em tubos contendo 3 mL do meio de cultura BHI (Himedia). Após incubação de 18-24 horas à temperatura de 37°C, 1430µL da suspensão bacteriana crescida em BHI foram acrescidos de 570µL de glicerol 70%, para obtenção de uma concentração final de 20% de glicerol e os tubos mantidos à -80°C.

Quando necessário, alíquotas das culturas armazenadas à -80°C foram semeadas em caldo BHI (Himedia), incubadas à temperatura de 37°C por 18-24 horas e em seguida foram submetidas a experimentos subsequentes.

3.4 - Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

O teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado de acordo com as normas de procedimento do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). As 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis listadas na Tabela 4, após crescimento em caldo BHI (Himedia) à 37°C por 18-24 horas, foram semeadas em tubos com ágar Müeller-Hinton (Himedia) e incubadas à 37°C por 18-24 horas. Em seguida, foi feita uma suspensão das linhagens em solução salina 0,8% até que atingissem a escala 0,5 de MacFarland e com um *swab*, estas foram semeadas em placas de Petri de 20X150mm com ágar Müeller-Hinton (Himedia). Os discos de antimicrobianos (CECON) foram colocados sobre as placas, e estas foram incubadas à 37°C por 18-24 horas seguindo-se a leitura dos halos de inibição. Os 10 antibióticos utilizados foram: amicacina (30µg), tetraciclina (30µg), ampicilina (10µg), cefalotina (30µg), sulfametoxazol-trimetoprima (25µg), ácido nalidíxico (30µg), estreptomicina (10µg), ceftriaxona (30µg), cloranfenicol (30µg), ciprofloxacina (30µg), ofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg) e lomefloxacina (10 µg).

3.5 - Extração e verificação da pureza do DNA genômico

O DNA genômico bacteriano foi extraído de todas as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis listadas na Tabela 4, segundo protocolo descrito por (ROSSOLINE et al., 1998; CAMPIONI e FALCÃO, 2013), e utilizado nos experimentos de reconfirmação molecular das linhagens, pesquisa de genes de

virulência, pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos por PCR, ERIC-PCR, MLST e MLVA.

As linhagens foram crescidas em 3,0mL de meio BHI e incubadas a 37°C por 18-24 horas. Em seguida, foram sedimentadas por centrifugação (20817 x g por 3 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf) e o sedimento suspenso em 250 µL de solução I (20% de sacarose, Tris-HCL 50 mM pH 8,0 e EDTA 50 mM) a 4°C. Após 10 minutos em gelo, as células foram lisadas com 500 µL de solução II (NaCl 50 mM e 1% de sarcosil e 0,05mg/mL de proteinase K). As linhagens submetidas à purificação do DNA genômico com 750 µL de uma mistura de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugadas a 20817 x g por 10 minutos, em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de centrífuga de 1,5 mL e a ele foi adicionado 750 µL de uma solução de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), em seguida centrifugado a 20817 x g por 10 minutos em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf. O sobrenadante foi coletado e novamente transferido para um novo tubo de centrífuga de 1,5 mL; a ele foi adicionado 1 mL de etanol a 4°C e o DNA foi precipitado em gelo por 15 minutos. Em seguida, o DNA foi sedimentado por centrifugação (4°C/20817 x g/15 minutos/em centrífuga 5810 R da marca Eppendorf). O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento seco a vácuo em “Speed vac” (Concentrator 5301, Eppendorf) e, posteriormente, suspenso em 400 µL de água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Life Technologies). Aos 400 µL de suspensão de DNA, foram adicionados 2 µL de RNase 50 µg/mL e incubados em banho de água a 37°C por 1 hora.

A integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8% preparado com TAE (Tris Acetato EDTA) 1X. A 5 µL do DNA extraído foram adicionados 3 µL de solução de azul de bromofenol (40% de sacarose, 0,25% de azul de bromofenol e água destilada q.s.p.). A eletroforese foi conduzida a 80 Volts até o marcador azul de bromofenol alcançar aproximadamente metade do gel. Os géis foram corados com solução de brometo de etídeo (1,0 µg/mL por 30 minutos), e observados em transluminador ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados em *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

A concentração e a pureza do DNA genômico extraído também foram analisadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta (UV MINI 1240, SHIMADZU) com comprimentos de onda (λ) de 260 nm e 280 nm (Sambrook e Russel, 2001).

Foram consideradas como boas as extrações de pureza entre 1,6 e 1,8 (A_{260nm}/A_{280nm}), pois esses valores demonstram que a amostra de DNA está com baixo nível de impurezas. Para amostras acima ou abaixo desses valores uma nova extração foi realizada.

3.6 - Reconfirmação Molecular das linhagens de *Salmonella* Enteritidis

Todas as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas (Tabela 4) foram reconfirmadas molecularmente através da pesquisa do gene específico dessa sorovariedade, *sdfl*. Para isso, o DNA genômico das linhagens foi extraído conforme descrito no item 3.5. Em seguida foi realizada uma PCR cujos reagentes estão descritos na Tabela 5. Os ciclos utilizados na PCR tiveram uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de: desnaturação a 94°C por 45 segundos, hibridação do *primer* a 53°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e ciclo final de extensão a 72°C por 15 minutos. A sequência dos *primers* está descrita no Anexo II.

Tabela 5 – Descrição dos reagentes utilizados na pesquisa de genes por PCR nas linhagens de *S. Enteritidis* estudadas.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final
10x Tampão "PCR Buffer" ^a	5	1x
10mM "dNTP mixture" ^a	1	0,2mM cada DNTP
<i>Primer forward</i> ^a	2,5	25pmol
<i>Primer reverse</i> ^a	2,5	25pmol
50 mM MgCl ₂ ^a	2	2mM
DNA Genômico (10ng/µl)	5	50ng
Taq-DNA Polimerase ^a 2U	0,25	1U
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	qsp-50	_____

3.7 Pesquisa de genes de virulência por PCR

A pesquisa de genes de virulência por PCR foi realizada em todas as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis listadas na Tabela 4.

Os reagentes utilizados para a realização da amplificação dos genes de virulência são os mesmos descritos na Tabela 5.

Os genes pesquisados foram *invA*, *sipA*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *ssaR*, *sifA*, *spvB*, *prot6E*, *flgK*, *fljB* e *flgL*, cujas seqüências dos pares de *primers* estão no Anexo II. Amostras sem o DNA foram usadas como controle negativo.

As condições das reações de amplificação foram desnaturação inicial do DNA genômico por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de separação das fitas de DNA a 94°C por 45 segundos, hibridação dos *primers* com temperatura específica para cada *primer* (Anexo II) por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, foi realizada a etapa de extensão final de 72°C por 15 minutos.

O termociclador utilizado foi o DNAEngine® Peltier Thermal Cycler (Bio-Rad). O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1X. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Invitrogen). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (1,0 µg/mL por 30 minutos), visualizados em transluminador de luz U.V. (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

3.8 Determinação dos mecanismos de resistência a quinolonas e da concentração inibitória mínima a fluoroquinolona ciprofloxacina

3.8.1 High-resolution melting analysis (HRMA)

A técnica de HRMA foi realizada para todas as 80 linhagens que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e que estão destacadas com um * na Tabela 4 e também para outras 20 linhagens sensíveis a esse antimicrobiano, que foram escolhidas para serem comparadas às linhagens resistentes. As linhagens sensíveis escolhidas foram a SE 4, SE 5, SE 11, SE 30, SE 43, SE 56, SE 88, SE 100, SE 120, SE 150, SE 185, SE 193, SE 241, SE 247, SE 252, SE 304/04, SE 69/05, SE 110/06, SE 189/07 e SE 257/08. Essa metodologia foi utilizada para a detecção de possíveis mutações na *quinolone-resistance-determining-region* (QRDR) do gene *gyrA*.

Cada reação foi realizada em um volume final de 20 µL contendo 10 µL de MeltDoctor™ HRM Master Mix (Applied Biosystems), 1,2 µL de cada *primer* a 5 µM, 4 µL de DNA genômico a 5 ng/ µL e 3,6 µL de água ultrapura, livre de DNase e RNase (Life Technologies).

As condições da PCR foram de 1 ciclo a 95°C por 10 minutos e 40 ciclos que consistiam de 95°C por 15 segundos e temperatura de hibridação dos *primers* (Anexo II) por 1 minuto. Reações sem DNA foram utilizadas como controle negativo.

A etapa da HRMA foi realizada imediatamente após a etapa de amplificação. Para isso, os amplicons foram aquecidos a 95°C por 10 segundos, e então foram resfriados a 60°C por 1 minuto. As curvas de *melting* foram geradas aumentando-se a temperatura em 1,6°C por segundo, partindo-se de 60°C até 95°C. A fluorescência foi detectada a cada 0,1 segundos.

A normalização das curvas de *melting* foi realizada ajustando-se uma região pré e pós *melting* dos amplicons.

Heteroduplexes foram gerados para diferenciar perfis que apresentaram pontos de mutação com bases complementares, por exemplo, A-T e T-A, adicionando-se uma amostra de DNA exógeno com sequência conhecida à amostra teste.

As curvas normalizadas foram analisadas com o programa 7500 2.0 (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. O programa agrupa amplicons que possuem curvas de melting similares.

O equipamento utilizado para a técnica de HRMA foi o 7500 Fast Real-Time PCR System apparatus (Applied Biosystems).

3.8.2 Amplificação e sequenciamento da *quinolone-resistance-determining-region* (QRDR) do gene *gyrA*

A amplificação da *quinolone-resistance-determining-region* (QRDR) do gene *gyrA* foi realizada por PCR em algumas linhagens representativas escolhidas de cada grupo gerado por HRMA. Em seguida essas linhagens foram enviadas para sequenciamento dessa região amplificada. Especificamente, foram amplificadas e sequenciadas seis linhagens sensíveis, a SE 4, SE 5, SE 11, SE 241, SE 110/06, e a SE 257/08; uma linhagem resistente do grupo A, a SE 191/07; oito linhagens resistentes do grupo B, a SE 126, SE 231, SE 151, SE 34/04, SE 332/05, SE 98/06, SE 203/08 e a SE 141/09; cinco linhagens resistentes do grupo C, a SE 50, SE 273, SE 67/05, SE 139/07 e a SE 197/10; quatro linhagens resistentes do grupo D, a SE 144, SE 168, SE 199 e a SE 211.

Os reagentes utilizados na PCR para as amplificações estão descritos na Tabela 5, utilizando-se ao invés de MgCl₂, o MgSO₄ (Invitrogen) e Taq DNA Polimerase *High Fidelity* (Life Technologies). Os primers utilizados foram o GyrA1 e o StgyrA2 (IDT-DNA) (Anexo II). Amostras do *mix* completo, sem o DNA foram usadas como controle negativo.

As condições das reações de amplificação foram de desnaturação inicial do DNA genômico por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de separação das fitas de DNA a 94°C por 45 segundos, hibridação dos *primers* com temperatura específica (Anexo II) por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, foi realizada a etapa de extensão final de 72°C por 15 minutos.

O termociclador utilizado foi o *DNAEngine® Peltier Thermal Cyclers* (Bio-Rad). O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1X. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Life Technologies). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL por 30 minutos), visualizados em transluminador de luz U.V. (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

O sequenciamento foi realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto no sequenciador MegaBACE (GE Healthcare-Amersham Biosciences), conforme descrito por (SOUZA et al., 2010).

Para isso, 1µl do produto de PCR e 0,8µl de cada *primer*, foram adicionados a 4µl de solução do kit *DYEnamic™ ET Dye Terminator* (GE Healthcare), próprio para o sequenciamento no *MegaBACE™* e água deionizada esterilizada suficiente para o volume final de 10µl em microplaca de 96 poços. Em seguida, a reação foi submetida à amplificação no termociclador *DNAEngine® Peltier Thermal Cyclers* (Bio-Rad), onde as condições de corrida foram as seguintes: 95° por 2 segundos, 95°C por 10 segundos, 51°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, repetindo essas três últimas condições por 35 vezes.

Ao completar as reações, as amostras em microplacas de 96 poços foram preparadas para o sequenciamento, seguindo o protocolo de precipitação sugerido pelo manual do *kit* de sequenciamento. Finalmente, as amostras foram sequenciadas no *MegaBACE™ 1000* (GE Healthcare) e os resultados foram salvos em eletroferogramas na extensão *abd*. As seqüências obtidas foram analisadas individualmente através do programa *ChromasPro* (Technelysium Pty Ltd).

Para cada uma das linhagens estudadas foram feitas duas reações de sequenciamento com o *primer forward* e duas reações com o *primer reverse*.

3.8.3 Pesquisa de genes plasmidiais de resistência e do gene codificador de bomba de efluxo

Os genes plasmidiais de resistência *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* e o gene cromossomal *qepA*, codificador de bomba de efluxo, foram pesquisados em todas as 80 linhagens que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico (destacadas com * na Tabela 4) e também em 20 linhagens sensíveis a esse antimicrobiano, que foram escolhidas para serem comparadas às linhagens resistentes e mencionadas no item 3.8.2. As condições da PCR são as mesmas apresentadas no item 3.7 e as sequências dos pares de primers estão apresentadas no Anexo II.

3.8.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) a ciprofloxacina

A concentração inibitória mínima a ciprofloxacina foi determinada para 80 linhagens que apresentaram resistência ao ácido nalidíxico (Tabela 4) e também em 20 linhagens sensíveis a esse antimicrobiano (item 3.8.2), que foram escolhidas para serem comparadas às linhagens resistentes.

Para isso, o procedimento realizado foi o mesmo apresentado no teste de susceptibilidade a antimicrobianos (item 3.5), porém, ao invés de discos de antimicrobianos utilizaram-se fitas de Etest® (bioMérieux) do antibiótico ciprofloxacina.

3.9 Amplificação das sequências ERIC para o ensaio de ERIC-PCR

As sequências ERIC foram amplificadas para todas as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis listadas na Tabela 4.

A PCR foi realizada utilizando-se reagentes para o volume final de 50 µL e seguiram as condições descritas por Versalovic e colaboradores (Versalovic, Koeuth e Lupski, 1991), com algumas modificações. Os *primers* utilizados foram: ERIC1 e ERIC 2 (Anexo II). A Tabela 6 traz de forma detalhada os reagentes utilizados para a realização da técnica de ERIC-PCR.

O termociclador utilizado para o ensaio de ERIC-PCR foi o *DNAEngine® Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad).

As condições das reações de amplificação foram de um ciclo de desnaturação inicial do DNA genômico por aquecimento a 94°C por 7 minutos, seguido por 30 ciclos constituídos de separação das fitas de DNA a 94° por 30 segundos, hibridação

dos *primers* a 52°C por 1 minuto e extensão das fitas a 65°C por 8 minutos. Após 30 ciclos, foi realizada a etapa de extensão final de 65°C por 10 minutos.

Os produtos de amplificação de ERIC-PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose, corados com brometo de etídeo (1.0 µg/mL por 30 minutos) e observados em transluminador de luz U.V. (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

Cada amplificação foi repetida duas vezes para verificar a reprodutibilidade do ensaio.

Tabela 6 – Descrição dos reagentes utilizados no ensaio de ERIC-PCR para *Salmonella* Enteritidis

Componentes	Volume (µL)
10x Tampão "PC2 Buffer" ^b	5
10mM "dNTP mixture" ^a	6,25
ERIC 1R (10 pmol/µL) ^a	5
ERIC 2 (10 pmol/µL) ^a	5
50 mM MgCl ₂ ^a	5
DNA Genômico (10 ng/µL)	10
Klen Taq1 ^{TM} DNA Polimerase (1U/µL) ^b	2
Água destilada ultra pura livre de DNase e RNase ^a	qsp-50

^a Produto Life Technologies; ^b Produto Ab Peptides.

3.10 Forma de análise de resultados do ERIC-PCR

Para ERIC-PCR, as análises das linhagens isoladas de humanos e alimentos foram realizadas separadamente das linhagens isoladas de frangos. Isso foi devido às últimas linhagens terem sido incluídas no projeto em período posterior ao das primeiras que já haviam sido enviadas para publicação.

A análise filogenética dos dados foi feita conforme descrito por (Souza *et al.*, 2010), utilizando-se o programa *Bionumerics* (AppliedMaths, Keijkstraat, Belgium). Somente as bandas entre 150 e 5000 pb em tamanho foram incluídas nessa análise.

A construção do dendrograma de similaridade genômica foi realizada utilizando-se o método UPGMA e os cálculos de similaridade utilizando-se o coeficiente de similaridade DICE. Um padrão de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Life Technologies) foi incluído três vezes em cada gel com o objetivo de normalizar as imagens para validação da técnica de ERIC-PCR e dessa forma possibilitar a comparação dos *fingerprints* nos diferentes géis.

3.11 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada para todas as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas (Tabela 4). Para isso, as linhagens foram cultivadas em caldo BHI e incubadas por 8 horas a 37°C. Posteriormente, as linhagens foram semeadas em placas de ágar Müller- Hinton e incubadas a 37°C por 12 a 18 horas. Em seguida foi feita a suspensão de algumas colônias em solução de suspensão de células (10mM Tris, pH7,2; 20mM NaCl; 50mM EDTA) até que essa suspensão atingisse a densidade ótica (D.O.) entre 0.6 e 0.9. Em seguida os tubos foram colocados em banho-seco a 50°C onde foram adicionados 500µL de agarose *low melting* 2% (Life Technologies) em cada tubo e 70 µL da mistura foi passada para cada poço de um molde para a confecção dos *plugs*.

Após a solidificação dos *plugs*, estes foram passados para tubos tipo *Falcon* de 15mL com 5mL de tampão para lisozima (10mM Tris, pH7,2; 50mM NaCl; 0,2% de desoxicolato de sódio; 0,5% de sarcosil) com 1mg/mL de lisozima e foram incubados em banho de água a 37°C por duas horas. A solução de lisozima foi removida e os *plugs* foram lavados por 20 minutos com tampão de lavagem 1X (20mM Tris, pH 8,0; 50mM EDTA) sob leve agitação. Em seguida, o tampão de lavagem foi removido e adicionou-se 5mL de tampão para Proteinase K (100mM EDTA, pH 8,0; 0,2% desoxicolato de sódio; 1% sarcosil) com 0,5mg/mL de Proteinase K, seguido de incubação *over-night* a 50°C em banho de água. No dia seguinte, a solução de Proteinase K foi removida e os *plugs* foram lavados quatro vezes durante uma hora com 10 mL de tampão de lavagem 1X, sendo que na segunda lavagem foi adicionado ao tampão 1mM de *Phenil Metil Sulfonyl Fluoride* (PMSF). Os *plugs* foram estocados a 4°C em tampão de lavagem 1X.

A digestão dos *plugs* foi feita separando-se 1 *plug* em um tubo tipo eppendorf de 2,0mL, seguido de três lavagens por uma hora com 1mL de tampão de lavagem 0,1X. Em um novo tubo eppendorf, foi adicionado 1mL de tampão da enzima *XbaI* (Life Technologies) 1X e os *plugs* foram lavados sob leve agitação por uma hora. Em seguida, 300 µL de novo tampão da enzima *XbaI* 1X foi adicionado e os *plugs* foram lavados por mais 30 minutos. Após isso, 30 unidades da enzima *XbaI* (Life Technologies) foram adicionadas ao tampão e os *plugs* foram incubados durante a noite a 37°C em banho de água.

Após o tempo de incubação, o tampão com a enzima foi removido, 1mL de tampão de lavagem 1X foi adicionado e os *plugs* foram lavados sob leve agitação

por 30 minutos. Em seguida, estes foram transferidos para um gel de Agarose *Pulsed Field* ultrapura (USB) 1%, preparado com tampão TBE 0,5X (45mM Tris; 45mM ácido bórico; 1mM EDTA, pH 8,0), selados com uma fina camada de agarose *low melting* 1% e submetidos à corrida no aparelho CHEF-DRIII System (Bio-Rad), sob as seguintes condições de corrida descritas por Ribot e colaboradores (Ribot *et al.*, 2006):

- Tempo de corrida: 19 horas
- Voltagem: 6v/cm
- Ângulo: 120°
- Pulso inicial: 2,2 segundos
- Pulso final: 63,8 segundos
- Temperatura da corrida: 14°C
- Tampão de corrida: TBE 0,5X

Após as corridas, os géis foram corados com brometo de etídio (Life Technologies) 0,5mg/mL por 30 minutos, descorados em água por 20 minutos, observados em transluminador de luz U.V. (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

3.11.1 Forma de análise de resultados do PFGE

A tipagem pelas metodologias de ERIC-PCR e PFGE foi realizada separadamente para as linhagens de humanos e alimentos e para as linhagens de frangos, pois dessa forma foi possível fazer uma análise mais específica da interação de linhagens isoladas tanto de material clínico de frangos quanto do ambiente da granja.

A análise filogenética dos dados foi feita conforme descrito por (Souza *et al.*, 2010), utilizando-se o programa *Bionumerics* (AppliedMaths, Keijkstraat, Belgium). Somente bandas entre 48,5 e 679 kb foram incluídas na análise.

A construção do dendrograma foi realizada utilizando-se o método UPGMA e os cálculos de similaridade utilizando-se o coeficiente de similaridade DICE. Um padrão de peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker – New England) foi incluído três vezes em cada gel com o objetivo de normalizar as imagens para validação da técnica de PFGE e dessa forma possibilitar a comparação dos perfis nos diferentes géis.

3.12 Cálculo do índice de discriminação

Para o cálculo do índice de discriminação de ERIC-PCR e PFGE utilizado no presente trabalho foi utilizada uma variação do índice de diversidade de Simpson (Simpson, 1949), que foi inicialmente desenvolvido para o estudo da diversidade animal em diferentes *habitats*. O índice de discriminação (D) utilizado (Hunter e Gaston, 1988) baseia-se na probabilidade de que duas linhagens não relacionadas, escolhidas aleatoriamente dentro de uma população, se localizem dentro de grupos de tipagem distintos. O índice D é obtido de acordo com a seguinte fórmula:

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

Onde N representa o número total de linhagens estudadas, s é o número total de tipos obtidos no dendrograma e n_j é o número de amostras que pertencem ao tipo j .

3.13 Multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA)

3.13.1 Amplificação dos loci para MLVA

A técnica de MLVA foi realizada para todas as 188 linhagens estudadas (Tabela 4) e comparadas a linhagens isoladas nos Estados Unidos e Canadá, previamente tipadas por Shah e colaboradores (SHAH et al., 2011a; SHAH et al., 2011b). Essa metodologia foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Devendra H. Shah na Washington State University, Pullman, WA, EUA.

Para isso foram amplificadas nove diferentes regiões do genoma de *S. Enteritidis* padronizadas por Malorny e colaboradores (Malorny, Junker e Helmuth, 2008). As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25 µL contendo 50 ng de DNA genômico, 12,5 µL de *Multiplex-PCR master mix* (Qiagen), 1,25 µL de solução Q (Qiagen) integrante do *master mix*, 1 pmol de cada par dos *primers* SENTER1, SENTER2, SENTER3, SE-7 (Life Technologies) e 0,25 pmol de cada par dos *primers* SENTER4, SENTER5, SENTER6, SENTER7 e SE-3 (Life Technologies), respectivamente. As sequências dos *primers* estão descritas no Anexo II. O loci

SENTR2 foi excluído da análise para permitir a comparação com as linhagens da América do Norte que não tiveram esse *locus* analisado por problemas de amplificação. Ademais, esse *locus* se apresentou como não discriminatório e, portanto, não afetou a análise das linhagens do presente estudo.

As condições da amplificação dos *loci* foram de desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos, seguida de 28 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 90 segundos e 72°C por 90 segundos. Após os 28 ciclos, foi realizada uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos.

As amplificações foram realizadas no termociclador *C1000™ Thermal Cycler* (BioRad). Reações sem DNA foram utilizadas como controle negativo.

3.13.2 Eletroforese capilar

Após a amplificação, a reação multiplex referente a cada uma das linhagens foi diluída na proporção 1:10 com água destilada ultra pura livre de DNase e RNase (Life Technologies). Em seguida, 0,5 µL da diluição foi misturado com 0,5 µL do padrão de peso molecular *GS1200LIZ* (Life Technologies) e com 19 µL de *Hi-Di Formamide* (Life Technologies).

A eletroforese capilar foi realizada no Genomics Core Laboratory da Washington State University com o equipamento ABI-3730 DNA analyzer usando o polímero POP-7. Cada reação foi realizada em duplicata em dias diferentes.

3.13.3 Forma de análise dos resultados do MLVA

Cada pico proveniente da eletroforese capilar, resultante da amplificação de cada *locus*, foi identificado de acordo com a cor do fluoróforo de cada *primer* e o tamanho utilizando-se o programa *GeneMarker* (Softgenetics LLC).

O tamanho dos fragmentos foi convertido em números aproximados de repetições da sequência daquele *locus* baseado nos dados de Malorny e colaboradores (MALORNY, JUNKER E HELMUTH, 2008). Em seguida, foi construída uma tabela com o número de repetições de cada *locus* para cada linhagem e um dendrograma de similaridade genômica foi construído com o programa *BioNumerics* (Applied Maths) pelo método UPGMA, utilizando-se o coeficiente categórico.

3.14 Multilocus sequence typing (MLST)

3.14.1 Escolha das linhagens

Para a metodologia de MLST, foram escolhidas 46 linhagens, destacadas na Tabela 4. Essas linhagens são representativas de cada ano do período em estudo, 1986 a 2010, bem como representativas das diferentes fontes de isolamento, humanos, alimentos e frangos.

3.14.2 Amplificação de genes *housekeeping*

Para os experimentos de MLST, foi tomada como base a metodologia previamente padronizada e disponível no banco de dados de MLST para *Salmonella enterica* (MLST Databases at the ERI University College Cork: http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html). As linhagens estudadas foram cadastradas e seus dados disponibilizados no referido banco de dados de MLST. Esses dados foram utilizados para compará-las entre si e com as linhagens de *Salmonella* Enteritidis disponibilizadas *on line*, provenientes de diferentes partes do mundo.

Para isso, foram amplificados sete genes de manutenção (*housekeeping genes*) de *Salmonella enterica*, sendo eles:

- *thrA* (aspartato quinase + homoserina desidrogenase);
- *purE* (fosforibosil aminoimidazol carboxilase);
- *sucA* (alfa cetoglutarato desidrogenase);
- *hisD* (histidinol desidrogenase);
- *aroC* (corismato sintase);
- *hemD* (uroporfirinogenio III cosintase);
- *dnaN* (DNA polimerase III subunidade beta).

As sequências dos pares de *primers*, nomeados de acordo com os *loci* a serem analisados e, as condições de amplificação que foram inicialmente utilizadas podem ser encontradas na página da rede: http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html e também no Anexo II.

As amplificações foram realizadas para cada gene separadamente em um volume final de 50 µL contendo 50 ng de DNA genômico, 25 pmol de cada primer específico (IDT-DNA) (Anexo II), tampão 1X (Life Technologies), cada

deoxiribonucleotídeo a 0,2 mM (Life Technologies), 2 mM MgSO₄ (Life Technologies) e 1 U de Taq DNA Polimerase *High Fidelity* (Life Technologies). Amostras do mix completo, sem o DNA foram usadas como controle negativo.

As condições das reações de amplificação foram de desnaturação inicial do DNA genômico por aquecimento a 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos de separação das fitas de DNA a 94°C por 45 segundos, hibridação dos *primers* com temperatura específica (Tabela X) por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após os 30 ciclos, foi realizada a etapa de extensão final de 72°C por 15 minutos.

O termociclador utilizado foi o *DNAEngine® Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad). O produto amplificado foi visualizado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, preparado em tampão TAE 1X. Cada corrida eletroforética continha um marcador de peso molecular (1Kb Plus DNA Ladder – Life Technologies). Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de brometo de etídeo (0,5 µg/mL por 30 minutos), visualizados em transluminador de luz U.V. (Gel Doc XR, Bio-Rad) e registrados com o *software* fotográfico (Quantity One 4.6.1, Bio-Rad).

3.14.3 Sequenciamento

O sequenciamento foi realizado no Hemocentro de Ribeirão Preto no sequenciador MegaBACE (GE Healthcare-Amersham Biosciences), conforme descrito por (SOUZA et al., 2010).

Para isso, 1 µl de cada produto de PCR e 0,8 µl de cada respectivo iniciador ou *primer*, especificamente desenhados para o sequenciamento dos genes *housekeeping*, foram adicionados a 4 µl de solução do kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (GE Healthcare), próprio para o sequenciamento no MegaBACE™ e água deionizada esterilizada suficiente para o volume final de 10 µl em microplaca de 96 poços. Em seguida, a reação foi submetida à amplificação no termociclador *DNAEngine® Peltier Thermal Cycler* (Bio-Rad), onde as condições de corrida foram as seguintes: 95° por 2 segundos, 95°C por 10 segundos, 51°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, repetindo essas três últimas condições por 35 vezes.

Ao completar as reações, as amostras em microplacas de 96 poços foram preparadas para o sequenciamento, seguindo o protocolo de precipitação sugerido pelo manual do *kit* de sequenciamento. Finalmente, as amostras foram sequenciadas no MegaBACE™ 1000 (GE Healthcare) e os resultados foram salvos

em eletroferogramas na extensão *abd*. As sequências obtidas foram analisadas individualmente através do programa *ChromasPro* (Technelysium Pty Ltd) para posterior análise *online* do perfil de mutação apresentado em cada linhagem estudada.

As sequências dos *primers* utilizados no sequenciamento podem ser encontradas na página: http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html e no Anexo II.

Para cada uma das 48 linhagens estudadas foram sequenciados os sete genes *housekeeping*, sendo realizadas duas reações com cada um dos *primers forward* e duas reações com cada um dos *primers reverse*.

3.14.4 Forma de análise de resultados do MLST

As análises das sequências dos genes *housekeeping* de cada linhagem estudada foram realizadas no website http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html, recebendo um número de alelo para cada gene de acordo com o perfil de mutação apresentado. Ao final, cada linhagem obteve um conjunto de sete alelos, um para cada gene estudado e, este conjunto foi representado por outro número chamado *Sequence Type* (ST).

Todos os dados referentes a cada linhagem foram disponibilizados no website http://mlst.ucc.ie/mlst/dbs/Senterica/documents/primersEnterica_html. O diagrama de similaridade genética foi construído utilizando-se o programa eBURSTv3, também disponível *online* (<http://eburst.mlst.net>). Nesse diagrama, foi possível comparar as linhagens do presente estudo com linhagens de diversas localidades geográficas contidas no banco de dados através do ST de cada linhagem, dessa forma, foi possível determinar a relação entre as linhagens e também separá-las em grupos, representados por complexos clonais, quando existentes, sendo realizada uma análise global.

4. RESULTADOS

4.1 Reativação e reconfirmação da pureza das linhagens de *Salmonella* Enteritidis

Todas as 188 linhagens listadas na Tabela 4 submetidas à reconfirmação bioquímica e da pureza, foram reconfirmadas como *Salmonella* spp..

4.2 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

Todas as 188 linhagens estudadas (Tabela 4) foram sensíveis aos antimicrobianos amicacina, tetraciclina, ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, cloranfenicol, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina, norfloxacina e lomefloxacina.

A Tabela 7 traz o perfil de resistência encontrado nas linhagens estudadas. Oitenta linhagens (42,5%) apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e apenas uma linhagem (0,5%) apresentou ao mesmo tempo resistência aos antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprima e estreptomicina.

Tabela 7 - Perfil de resistência aos antimicrobianos ácido nalidíxico, amicacina, ampicilina, cefalotina, ceftriaxona, ciprofloxacina, cloranfenicol, estreptomicina, levofloxacina, lomefloxacina, norfloxacina, ofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprima e tetraciclina de 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, de alimentos e de frangos

Antimicrobiano	Número de linhagens (%)			Total de linhagens
	Humanos (n=67)	Alimentos (n=61)	Frangos (n=60)	
Sulfametoxazol-trimetoprima	1 (1,4)	0	0	1 (0,5)
Estreptomicina	1 (1,4)	0	0	1 (0,5)
Ácido nalidíxico	20 (10,6)	16 (8,5)	44 (23,4)	80 (42,5)

4.3 Extração e verificação da pureza do DNA genômico

A Figura 2 traz uma eletroforese em gel de agarose para avaliação da integridade do DNA genômico de algumas das linhagens de *S. Enteritidis* estudadas.

Todas as 188 linhagens estudadas apresentaram pureza entre 1,6 e 1,8.

Figura 2 – Gel de agarose 0,8% representativo dos produtos da extração do DNA genômico de algumas linhagens de *S. Enteritidis* estudadas. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 10: SE12, SE13, SE18, SE27, SE28, SE29, SE30, SE35, SE36 e SE37, respectivamente.

4.4 Reconfirmação molecular das linhagens de *Salmonella* Enteritidis

Todas as 188 linhagens listadas na Tabela 4 submetidas à reconfirmação molecular, foram reconfirmadas como *Salmonella* Enteritidis. A Figura 3 traz uma eletroforese em gel de agarose com a amplificação do gene *sdfl*, específico da sorovariedade Enteritidis, em algumas das linhagens estudadas.

Figura 3 – Gel de agarose 1,5%, representativo da amplificação do gene *sdfl*, de 333pb, em algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaletas de 1 a 18: SE29, SE30, SE32, SE33, SE35, SE36, SE37, SE38, SE39, SE41, SE43, SE48, SE50, SE56, SE59, SE60, SE66, SE67, respectivamente.

4.5 Pesquisa de genes de virulência por PCR

A Tabela 8 apresenta a frequência dos genes de virulência pesquisados nas 188 linhagens de *S. Enteritidis* listadas na Tabela 4.

Cento e oitenta e cinco linhagens estudadas (98,4%) apresentaram todos os 13 genes de virulência pesquisados. Somente uma linhagem (SE 76) foi negativa para o gene da IPS-1, *sipA*, e duas linhagens (SE 75 e SE 183) foram negativas para a presença do gene plasmidial *prot6E*.

Tabela 8 - Frequência dos genes de virulência *invA*, *sipA*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *ssaR*, *sifA*, *spvB*, *prot6E*, *flgK*, *fljB* e *flgL* em 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos, alimentos e frangos

Genes	Número de linhagens positivas (%)			Total de linhagens
	Humanos (n=67)	Alimentos (n=61)	Frangos (n=60)	
<i>invA</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>sipA</i>	67 (100)	60 (98,3)	60 (100)	187 (99,4)
<i>sipD</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>sopB</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>sopD</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>sopE2</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>ssaR</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>sifA</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>spvB</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>prot6E</i>	66 (98,5)	60 (98,3)	60 (100)	186 (98,9)
<i>flgK</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>fljB</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)
<i>flgL</i>	67 (100)	61 (100)	60 (100)	188 (100)

4.6 Determinação dos mecanismos de resistência a quinolonas e da concentração inibitória mínima de fluoroquinolonas

4.6.1 High-resolution melting analysis (HRMA)

A metodologia de HRMA dividiu as 80 linhagens resistentes ao ácido nalidíxico e as 20 linhagens sensíveis ao ácido nalidíxico em cinco perfis de *melting* diferentes.

Todas as 20 linhagens sensíveis ao ácido nalidíxico apresentaram o mesmo perfil de *melting* (perfil A), enquanto as linhagens resistentes foram divididas em

quatro perfis diferentes (perfis B,C, D e E). Os perfis D e E foram agrupados inicialmente na mesma curva de *melting* por apresentarem mutações de bases complementares (A-T e T-A). Dessa forma, foi necessária a realização de uma reação com a formação de heteroduplexes para dividir esses perfis (Figura 5).

As 20 linhagens sensíveis ao ácido nalidíxico utilizadas estão descritas no item 3.8. A única linhagem pertencente ao perfil B foi a SE 191/07 enquanto o perfil C compreendeu 15 linhagens, a SE 126, SE 127, SE 151, SE 230, SE 231, SE 34/04, SE 55/04, SE 67/04, SE 69/04, SE 332/05, SE 98/06, SE 150/06, SE 203/08, SE 227/08 e a SE 141/09. No perfil D, ficaram agrupadas 13 linhagens, a SE 135, SE 136, SE 139, SE 142, SE 143, SE 144, SE 168, SE 187, SE 191, SE 199, SE 200, SE 244 e a SE 211. No perfil E, ficaram agrupadas 51 linhagens, a SE 50, SE 198, SE 214, SE 223, SE 227, SE 233, SE 234, SE 246, SE 249, SE 251, SE 253, SE 255, SE 260, SE 263, SE 267, SE 269, SE 270, SE 273, SE 67/05, SE 73/05, SE 275/05, SE 348/05, SE 413/05, SE 27/06, SE 102/06, SE 387/06, SE 131/07, SE 135/07, SE 139/07, SE 143/07, SE 199/07, SE 255/07, SE 05/08, SE 27/08, SE 129/08, SE 133/08, SE 317/08, SE 327/08, SE 331/08, SE 11/09, SE 21/09, SE 37/09, SE 107/09, SE 113/09, SE 165/09, SE 217/09, SE 229/09, SE 179/10, SE 191/10, SE 197/10 e a SE 219/10.

A Figura 4 traz os cinco perfis gerados por HRMA e a Figura 5 mostra os perfis D e E separados após a formação de heteroduplexes.

Figura 4 – Perfis de *melting* resultantes das análises de HRMA para as 80 linhagens resistentes e 20 linhagens sensíveis de *Salmonella* Enteritidis ao ácido nalidíxico.

Figura 5 – Perfis de *melting* resultantes das análises de HRMA para as 13 linhagens de *Salmonella* Enteritidis pertencentes ao perfil D e para as 51 linhagens pertencentes ao perfil E.

4.6.2 Amplificação e sequenciamento da *quinolone-resistance-determining-region* (QRDR) do gene *gyrA*

A Figura 6 traz um gel representativo de uma eletroforese em gel de agarose com a amplificação de parte do gene *gyrA* utilizada para sequenciamento e análise de algumas linhagens de *S. Enteritidis* estudadas e a Figura 7 traz sequências representativas das linhagens sequenciadas de cada perfil gerado por HRMA (item 4.6.1).

As linhagens resistentes ao ácido nalidíxico apresentaram mutações na sequência de bases do gene *gyrA* que codificam nas linhagens sensíveis, caracterizadas como perfil A (Figura 4), os aminoácidos serina83, asparagina87 e serina97.

O perfil resistente B (Figura 4), apresentou uma mutação da base T para a base C na trinca de bases que codificam o aminoácido serina97, passando a codificar o aminoácido prolina97.

O perfil resistente C (Figura 4) apresentou uma mutação da base C para a base T na trinca de bases que codificam o aminoácido serina83, passando a codificar o aminoácido fenilalanina 83.

O perfil resistente D (Figura 4) apresentou uma mutação da base G para a base A na trinca de bases que codificam o aminoácido ácido aspártico87, passando a codificar o aminoácido asparagina87.

O perfil resistente E (Figura 4) apresentou uma mutação da base G para a base T na trinca de bases que codificam o aminoácido ácido aspártico87, passando a codificar o aminoácido tirosina87.

Figura 6 – Gel de agarose 1,5%, representativo da amplificação de parte do gene *gyrA* em algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaletas de 1 a 18: SE29, SE30, SE32, SE33, SE35, SE36, SE37, SE38, SE39, SE41, SE43, SE48, SE50, SE56, SE59, SE60, SE66, SE67, respectivamente.

Figura 7 – Sequências representativas das linhagens sequenciadas de cada perfil gerado por HRMA e sequência padrão do gene *gyrA* de *Salmonella* disponível no Gene Bank A: perfil resistente A, S: perfil linhagens sensíveis, P: sequência padrão *gyrA*, E: perfil resistente E, D: perfil resistente D, B: perfil resistente B.

4.6.3 Pesquisa de genes plasmidiais de resistência e do gene codificador de bomba de efluxo

Nenhuma das 188 linhagens de *S. Enteritidis* estudadas apresentou os genes plasmidiais de resistência *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* nem o gene cromossômico *qepA*

codificador da bomba de efluxo. Somente duas linhagens, a 107/09 e a 191/10, apresentaram o gene plasmidial *qnrB* (Figura 8).

Figura 8 – Géis de agarose 1,5%, representativos da amplificação do gene plasmidial *qnrB*, de 513 pb, em duas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaleta 5: SE 107/09 e canaleta 24: SE191/10.

4.6.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da ciprofloxacina

A Tabela 9 traz as médias das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) das 80 linhagens resistentes (marcadas com * na Tabela 3) de *S. Enteritidis* e das 20 linhagens (item 3.8) sensíveis ao ácido nalidíxico frente ao antimicrobiano ciprofloxacina. A mesma Tabela traz a média das CIMs nos diferentes perfis de resistência encontrados.

Todas as 100 linhagens sensíveis ou resistentes ao ácido nalidíxico foram sensíveis a ciprofloxacina (CIM < 1,0). Entretanto, as linhagens resistentes ao ácido nalidíxico (marcadas com * na Tabela 3) apresentaram sensibilidade reduzida a ciprofloxacina (Tabela 8). Entre os perfis resistentes, o perfil C (Figura 6) foi o que apresentou maior redução da sensibilidade (Tabela 9).

As duas linhagens que apresentaram o gene *qnrB*, pertencem ao perfil E e não apresentaram diferença na sensibilidade em comparação às outras linhagens estudadas.

A Figura 9 é ilustrativa do ensaio realizado com o Etest® e mostra a concentração inibitória mínima (CIM) de uma linhagem resistente ao ácido nalidíxico (SE 211, perfil de HRMA D) em comparação ao de uma linhagem sensível ao ácido nalidíxico (SE 120, perfil de HRMA A).

Tabela 9 – Média das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da ciprofloxacina nas 80 linhagens de *Salmonella* Enteritidis resistentes ao ácido nalidíxico em comparação as 20 linhagens sensíveis e comparação das CIMs nos diferentes perfis de mutação no gene *gyrA*

Linhagens	Média dos CIMs (µg/mL)	Menor CIM encontrado (µg/mL)	Maior CIM encontrado (µg/mL)	Perfis de mutação no <i>gyrA</i>	Média das CIMs em cada perfil (µg/mL)	Perfil de HRMA
Sensíveis ao ácido nalidíxico	0,006	0,002	0,008	Ser83 Asp87 Ser97	0,006	A
Resistentes ao ácido nalidíxico	0,09	0,047	0,19	Ser83 Asp87 Pro97	0,064	B
				Fen83 Asp87 Ser97	0,138	C
				Ser83 Asn87 Ser97	0,091	D
				Ser83 Tir87 Ser97	0,086	E

Figura 9 – Placas representativas do ensaio com o Etest® de ciprofloxacina para uma linhagem resistente (SE 211, esquerda) com concentração inibitória mínima de 0,125 µg/mL e uma sensível ao ácido nalidíxico (SE 120, direita) com concentração inibitória mínima de 0,002 µg/mL.

4.7 Amplificação das sequências ERIC para o ensaio de ERIC-PCR

A Figura 10 traz um gel representativo de uma eletroforese em gel de agarose para visualização dos produtos de PCR gerados pelo ensaio de ERIC-PCR para 14 das 188 linhagens de *S. Enteritidis* estudadas isoladas de humanos e alimentos.

Nas duas repetições de ERIC-PCR, para cada uma das linhagens, o mesmo padrão de bandas foi encontrado em cada replicata. O padrão de bandas gerado variou entre 20 e 30 bandas em número e entre 100 e 5000 pb em tamanho.

Figura 10 – Gel de agarose 1,5%, representativo dos produtos de amplificação das sequências ERIC de algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas. M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Life Technologies). Canaletas de 1 a 17: SE28, SE29, SE30, SE32, SE33, SE35, SE36, SE37, SE38, SE39, SE41, SE43, SE48, SE50, SE56, SE59 e SE60, respectivamente.

4.8 Construção do dendrograma de similaridade genômica com os dados de ERIC-PCR

A análise do padrão de bandas obtido por ERIC-PCR para as 128 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos e alimentos (Tabela 4) gerou um dendrograma de similaridade genômica apresentado na Figura 11. Essas linhagens foram analisadas separadamente das 60 linhagens isoladas de frango, pois as últimas foram incluídas no estudo em período posterior a essa análise.

O dendrograma gerado com as linhagens de humanos e alimentos agrupou as linhagens em três grandes grupos denominados ERIC-A, ERIC-B e ERIC-C.

No grupo ERIC-A, foram agrupadas 112 linhagens, entre a SE12 e a SE128, que apresentaram similaridade de 85,4%. Essas 112 linhagens foram isoladas entre 1986 e 2006 de humanos (57) e alimentos (55) tanto de surtos (74) quanto de casos esporádicos (38) (Figura 11).

O grupo ERIC-B foi composto de oito linhagens, entre a SE135 e SE133, com similaridade de 88,6%. Essas linhagens foram isoladas entre 1999 e 2001 de humanos (3) e alimentos (5), tanto de surtos (6) quanto de casos esporádicos (2) (Figura 11).

O grupo ERIC-C foi composto de oito linhagens, entre a SE253 e SE273, que apresentaram 100% de similaridade. Essas linhagens foram isoladas de humanos

entre 2009 e 2010, sendo sete linhagens isoladas de diferentes surtos e somente uma isolada de caso esporádico (Figura 11).

A similaridade entre as linhagens dos três grupos gerados por ERIC-PCR para as linhagens de humanos e alimentos foi de 79,7% (Figura 11).

Os resultados de ERIC-PCR para as linhagens relacionadas a frangos serão apresentados concatenados com os resultados de PFGE em um item separado.

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (H=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]
ERIC-PCR

Figura 11- Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do padrão de bandas obtido por ERIC-PCR para 128 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas isoladas de humanos (67) e alimento (61).

4.9 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

A Figura 12 traz um gel representativo de uma eletroforese em campo pulsado em gel de agarose PFGE 1%, após clivagem do DNA genômico com a enzima de restrição *Xba*I para visualização dos fragmentos de restrição gerados pelo ensaio de PFGE para 12 das 128 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas isoladas de humanos e alimentos.

O padrão de bandas gerado foi de aproximadamente 20, considerando somente as bandas de peso molecular entre 48,5kb e 679kb.

Figura 12 – Gel de agarose 1,0%, representativo do ensaio de PFGE de algumas linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas após clivagem com a enzima *Xba*I. M: marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG Marker (New England). Canaletas de 1 a 12: SE125, SE126, SE127, SE128, SE129, SE130, SE131, SE132, SE133, SE134, SE 135 e SE 136, respectivamente.

4.10 Construção do dendrograma de similaridade genômica com os dados de PFGE

A análise do padrão de bandas obtidas por PFGE para as 128 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos (67) e alimentos (61) (Tabela 4) gerou um dendrograma de similaridade genômica apresentado na Figura 15. Essas linhagens foram analisadas separadamente das 60 linhagens isoladas de frango, pois as últimas foram incluídas no estudo em período posterior a essa análise.

O dendrograma gerado dividiu as 128 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos e alimentos em três grandes grupos designados PFGE-A, PFGE-B e PFGE-C (Figura 13).

No grupo PFGE-A, ficaram agrupadas 96 linhagens, entre a SE119 e SE86, com uma similaridade de 80,0%. Essas linhagens foram isoladas entre 1994 e 2007, de humanos (44) e alimentos (52), tanto de surtos (68) quanto de casos esporádicos (28) (Figura 13).

O grupo PFGE B foi composto de três linhagens, entre a SE4 e SE60, isoladas de humanos (2) e alimentos (1), tanto de surtos (1) quanto de casos esporádicos (2). Essas linhagens apresentaram uma similaridade de 78,3% e foram isoladas entre 1986 e 1996 (Figura 15).

O grupo PFGE-C foi composto por 28 linhagens, entre a SE27 e a SE233 com 74,5% de similaridade. Essas linhagens foram isoladas entre 1994 e 2010, de humanos (20) e de alimentos (8), tanto de surtos (17) quanto de casos esporádicos (11) (Figura 13).

A similaridade entre as linhagens dos três grupos foi de 73,1% (Figura 13).

Os resultados de PFGE para as linhagens relacionadas a frangos serão apresentados concatenados com os resultados de ERIC-PCR em um item separado.

Dice (Tol 1.2%-1.2%) (Ht=0.0% S=0.0%) [0.0%-100.0%]
PFGE

Figura 13- Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA e coeficiente de similaridade DICE a partir do padrão de bandas obtido pelo PFGE com a enzima *XbaI* para 128 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas isoladas de humanos (67) e alimentos (61).

4.11 Contrução dos dendrogramas de similaridade genômica com os dados de ERIC-PCR e PFGE para as linhagens de frangos

O dendrograma de similaridade genômica concatenado de ERIC-PCR e PFGE dividiu as 60 linhagens isoladas de casos clínicos de frangos e do ambiente da granja (Tabela 4) em dois grandes grupos denominados A e B (Figura 14).

O grupo A, entre a SE302/04 e SE67/04, foi composto por linhagens isoladas tanto de casos clínicos (23) quanto do ambiente da granja (5) com 81,2% de similaridade. Essas linhagens foram isoladas entre 2004 e 2009 (Figura 14).

O grupo B, entre a 257/08 e 21/09, foi composto por linhagens isoladas tanto de frangos (21) quanto do ambiente da granja (11) com 81,1% de similaridade. Essas linhagens foram isoladas entre 2006 e 2010 (Figura 14).

A similaridade entre as linhagens dos dois grupos foi maior do que 73,3% (Figura 14).

Figura 14 - Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA a partir dos padrões de bandas gerados por ERIC-PCR e PFGE com a enzima *Xba*I para as 60 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas relacionadas a frangos isoladas de material clínico (44) e do ambiente da granja (16).

4.12 Índice de discriminação

Para as análises com as linhagens de humanos e alimentos, o índice de discriminação (*D*) para a metodologia de ERIC-PCR foi de 0,97 e para PFGE foi de 0,98.

Nas análises com as linhagens relacionadas a frangos, o índice de discriminação (*D*) para a metodologia de ERIC-PCR foi de 0,93 e para PFGE foi de 0,90.

4.13 Contrução dos dendrogramas de similaridade genômica com os dados de MLVA

O dendrograma de similaridade genômica gerado com os dados de MLVA, dividiu as 188 linhagens isoladas no Brasil e as 100 linhagens isoladas na América do Norte em dois grandes grupos denominados MLVA-A e MLVA-B (Figura 15).

O grupo MLVA-A, foi constituído por 74 linhagens, entre a A08 e a C14, isoladas na América do Norte (71) entre 1986 e 2008 e no Brasil (3) isoladas em 1986, 1992 e 1998 com 46% de similaridade (Figura 15).

O grupo MLVA-B foi constituído por 214 linhagens, entre a SE413/05 e a SE244, isoladas tanto na América do Norte (29) entre 2004 e 2008 quanto no Brasil (185) isoladas entre 1994 e 2010 com 68,3% de similaridade. A similaridade entre os dois grupos foi de 35% (Figura 15).

A

SE 35	Surto 5	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1995
SE 36		Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1995
SE 41	Surto 7	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 43	Surto 7	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 48	Surto 8	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 56	Surto 8	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 68		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 70		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 73		Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 74		Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 75		Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1996
SE 85	Surto 13	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1997
SE 86	Surto 13	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1997
SE 87	Surto 14	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1997
SE 88	Surto 15	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1997
SE 89	Surto 16	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1998
SE 94		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1998
SE 96	Surto 17	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1998
SE 114	Surto 17	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1998
SE 116	Surto 19	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1998
SE 117		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1999
SE 126	Surto 21	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1999
SE 127	Surto 21	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1999
SE 130	Surto 24	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1999
SE 134	Surto 27	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	1999
SE 150		Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2000
SE 151		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2001
SE 165	Surto 33	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2001
SE 171		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2002
SE 173	Surto 35	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2002
SE 181	Surto 37	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2002
SE 183		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2002
SE 185		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2002
SE 186		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2002
SE 192		Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2002
SE 193		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2003
SE 197	Surto 39	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2003
SE 201	Surto 42	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2003
SE 206	Surto 43	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2004
SE 214		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2004
SE 223	Surto 45	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2004
SE 227	Surto 45	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2004
SE 230	Surto 46	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2004
SE 231		Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2004
SE 233	Surto 47	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2004
SE 234	Surto 47	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2004
SE 239	Surto 48	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2005
SE 241	Surto 48	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2005
SE 242	Surto 48	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2005
SE 247		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2006
SE 251	Surto 51	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2006
SE 253		Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2009
SE 255	Surto 53	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2009
SE 260	Surto 54	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2009
SE 263	Surto 55	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2009
SE 269	Surto 57	Alimentos	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2010
SE 270	Surto 57	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2010
SE 273	Surto 57	Humano	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2010
SE 05/08		Frango	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2008
SE 102/06		Frango	7-3-3-8-4-2-0-7	Brasil	2006
SE 107/09		Frango	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2009
SE 11/09		Frango	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2009
SE 110/06		Frango	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2006
SE 112/06		Frango	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2006
SE 113/09		Frango	7-3-4-9-4-2-0-7	Brasil	2009
SE 129/08		Frango	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2008
SE 131/07		Frango	7-3-3-8-4-2-0-7	Brasil	2007
SE 133/08		Frango	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2008
SE 135/07		Frango	7-3-3-8-4-2-0-7	Brasil	2007
SE 139/07		Frango	7-3-3-8-4-2-0-7	Brasil	2007
SE 141/09		Frango	7-3-3-11-4-2-0-7	Brasil	2009
SE 143/07		Frango	7-3-3-8-4-2-0-7	Brasil	2007
SE 150/06		Frango	7-3-3-9-4-2-0-7	Brasil	2008

Figura 15 - Dendrograma de similaridade genotípica gerado pelo método UPGMA e coeficiente categórico a partir dos dados de MLVA para as 188 linhagens de *Salmonella* Enteritidis isoladas de humanos (67), alimentos (61) e frangos (60) no Brasil e 100 linhagens isoladas de humanos (48) e frangos (52) na América do Norte.

4.14 Multilocus sequence typing (MLST)

4.14.1 Amplificação de genes *housekeeping*

Os sete genes *housekeeping* propostos no banco de dados de MLST para *Salmonella enterica* foram amplificados nas 46 linhagens escolhidas para tipagem.

Após a análise da corrida eletroforética em gel de agarose 1,5%, foi possível observar os tamanhos dos fragmentos obtidos para cada gene, confirmando suas amplificações. Os tamanhos dos fragmentos de cada gene amplificado estão no Anexo II. A Figura 16 traz um gel representativo da amplificação do gene *aroC* para algumas das linhagens tipadas por MLST.

Figura 16 – Gel de agarose 1,5%, representativo da amplificação do gene *aroC* em algumas linhagens de *Salmonella Enteritidis* estudadas M: marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). Canaletas de 1 a 18: SE4 (1), SE5(2), SE11 (3), SE13 (4), SE15 (5), SE16 (6), SE36 (7), SE60 (8), SE66 (9), SE70 (10), SE80 (11), SE86 (12), SE88 (13), SE94 (14), SE114 (15), SE117 (16), SE120 (17), SE133 (18), respectivamente.

4.14.2 Sequenciamento

Todas as sequências obtidas, referentes aos sete genes *housekeeping* para as 46 linhagens de *S. Enteritidis* (Tabela 4) foram consideradas satisfatórias para análise.

Após o alinhamento das duas sequências *forward* e duas sequências *reverse* para cada um dos sete genes, obteve-se uma sequência consenso individual de

cada linhagem. A Figura 17 é representativa e ilustra esse alinhamento. A seta indica uma mutação pontual que gerou um alelo diferente da sequência padrão.

Figura 17 – Alinhamento e análise de sequências do gene *sucA* de *Salmonella* Enteritidis pelo programa *ChromasPro*. A seta indica uma mutação pontual.

4.14.3 Diagramas de similaridade genética gerado com os dados de MLST

Entre as 46 linhagens selecionadas para o MLST (Tabela 4), 44 apresentaram os seguintes alelos: 5 (*aroC*), 2 (*dnaN*), 3 (*hemD*), 7 (*hisD*), 6 (*purE*), 6 (*sucA*) e 11 (*thrA*). A ordem desses alelos gerou o ST11. Duas das linhagens escolhidas para estudo apresentaram uma mutação pontual em um dos genes *housekeeping* estudados. Especificamente a linhagem SE 11 apresentou uma mutação no gene *sucA* e a linhagem SE 231 no gene *hemD*. Nenhum dos dois alelos encontrados nessas duas linhagens encontrava-se disponível no banco de dados e, por isso, geraram dois novos STs de *S. enterica*. Esses novos STs são linhagens *single locus variant* (SLV) do ST 11, visto que elas se diferenciam em somente um *locus* das linhagens daquele ST.

A Figura 18 traz o diagrama gerado a partir da análise das 6.094 linhagens de *S. enterica* disponíveis no banco de dados com as 46 linhagens de *S. Enteritidis*

tipadas por MLST no presente estudo. As outras linhagens de *S. Enteritidis* disponíveis no banco de dados foram circuladas em vermelho com seus respectivos números de ST.

A Figura 19 traz o diagrama gerado com as 46 linhagens de *S. Enteritidis* estudadas juntamente com as outras 304 linhagens de *S. Enteritidis* disponíveis no banco de dados de MLST. O ST 11, escrito em rosa, apresentou 12 *single locus variant* (SLV) (STs 136, 168, 183, 310, 366, 480, 616, 640, 745, 814, 1479 e 1558) e um *Double locus variant* (DLV) (ST 691). Os STs 6, 74, 77, 180 e 746 são representados cada um por uma linhagem de *S. Enteritidis* e não apresentaram associação a nenhum outro ST do banco de dados.

As linhagens de *S. Enteritidis* disponíveis no banco de dados foram provenientes de vários países como: Estados Unidos, Escócia, Cuba, Tunísia, Zimbábue, China, Japão entre outros e isoladas de diversas fontes como humanos, alimentos e de animais. Com relação a linhagens do Brasil, além das linhagens do presente estudo, somente uma linhagem pertencente ao ST 6 encontra-se no banco de dados.

Figura 18 – Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com os dados de todas as 6094 linhagens de *Salmonella enterica* disponíveis no banco de dados e com as 46 linhagens de *S. Enteritidis* estudadas pertencentes ao ST 11. Em vermelho estão os demais STs de *S. Enteritidis* do banco de dados; azul, STs centrais de complexos clonais; amarelo, realça o início de novos complexos clonais; preto, demais linhagens de *S. enterica*. O tamanho das esferas é proporcional a quantidade de linhagens.

Figura 19 – Diagrama de similaridade genética gerado pelo programa *eBURSTv3* com as 46 linhagens de *Salmonella* Enteritidis estudadas e todas as demais 304 linhagens de *S. Enteritidis* do banco de dados. O ST 11 foi o encontrado para 44 das 46 linhagens de *S. Enteritidis* estudadas; Os STs 1632 e 1633 foram os dois novos STs encontrados nesse estudo; em azul, ST central de complexos clonais; preto, demais linhagens de *S. enterica*. O tamanho das esferas é proporcional à quantidade de linhagens.

5. DISCUSSÃO

A salmonelose é um dos maiores problemas de saúde no mundo. Durante os anos 80, a sorovariedade Enteritidis emergiu como a maior causa de surtos de *Salmonella* em vários países. Atualmente, essa sorovariedade continua sendo a mais isolada de casos de salmonelose mundialmente. Dessa forma, estudos epidemiológicos são importantes para elucidar rotas de contaminação, melhorar o monitoramento e implementar programas de controle desse micro-organismo (OLIVE; BEAN, 1999; HENDRIKSEN et al., 2011).

As metodologias de tipagem baseiam-se no fato de que geralmente, micro-organismos causadores de um surto são derivados de uma mesma célula progenitora. A melhor metodologia a ser escolhida deve ser aquela rápida, de fácil interpretação, com grande poder discriminatório, baixo custo e principalmente reprodutível. Entretanto, nem sempre a metodologia mais adequada para determinado micro-organismo será utilizada com sucesso para os de outra espécie (OLIVE; BEAN, 1999).

Diferentes métodos fenotípicos e genotípicos têm sido utilizados na tipagem de linhagens de *Salmonella* Enteritidis. Entretanto, linhagens dessa sorovariedade têm demonstrado um alto grau de similaridade genotípica, o que algumas vezes dificulta as interpretações e levanta o questionamento se essas linhagens como um todo apresentam uma limitada diversidade genotípica, ou se ocorreu uma disseminação de um clone específico em determinado local (PANG et al., 2007; BOTTELDOORN et al., 2010).

A utilização de diferentes metodologias na tipagem de *S. Enteritidis* tem sido mais eficiente para responder a esses questionamentos do que a utilização de uma única técnica (HELMUTH; SCHROETER, 1994; LACONCHA et al., 1998; LACONCHA et al., 2000; LIEBANA et al., 2001; PANG et al., 2005; BOTTELDOORN et al., 2010; CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012; CAMPIONI et al., 2013).

O presente estudo utilizou diferentes metodologias para tipar 188 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, alimentos e frangos no Brasil entre 1986 e 2010. Além disso, a presença de alguns genes de virulência, a resistência dessas linhagens frente a alguns antimicrobianos bem como os mecanismos de resistência a quinolonas foi avaliado.

A tipagem pelas metodologias de ERIC-PCR e PFGE foi realizada separadamente para as linhagens de humanos e alimentos e para as linhagens de

frangos, pois dessa forma foi possível fazer uma análise mais específica da interação de linhagens isoladas tanto de material clínico de frangos quanto do ambiente da granja.

Quanto aos resultados de ERIC-PCR e PFGE para as linhagens de humanos e alimentos, em geral, ambas as metodologias mostraram resultados similares agrupando as linhagens em três principais grupos. Entretanto, linhagens pertencentes a um grupo específico de ERIC-PCR não necessariamente pertenceu ao mesmo grupo em PFGE (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

ERIC-PCR diferenciou as 128 linhagens isoladas de humanos e alimentos em 55 perfis diferentes, ou ERIC-tipos, divididos em três grandes grupos denominados ERIC-A, ERIC-B e ERIC-C com 79,7% de similaridade (Figura 11). Já a metodologia de PFGE diferenciou as mesmas linhagens em 68 perfis diferentes, ou PFGE-tipos divididos em três grandes grupos denominados PFGE-A, PFGE-B e PFGE-C com 73,1% de similaridade (Figura 13). Esses grupos nas duas metodologias mostraram que algumas linhagens isoladas de casos esporádicos foram indistinguíveis das linhagens isoladas de surtos. Ademais, linhagens isoladas durante diferentes surtos foram agrupadas (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012). As técnicas utilizadas no presente estudo apresentaram maior poder discriminatório do que a metodologia de ribotipagem utilizada por Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2003) que discriminou 105 linhagens isoladas entre 1975 e 1995 em 14 ribotipos.

Apesar dessas metodologias terem apresentado altos índices de discriminação (D), 0,97 para ERIC-PCR e 0,98 para PFGE, as linhagens apresentaram uma alta similaridade genotípica. Essa similaridade foi maior que 79,7% em ERIC-PCR e maior que 73,1% em PFGE, o que é significativo dado o longo período de isolamento de 24 anos no qual as linhagens foram isoladas (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

Pelo nosso conhecimento, existem poucos artigos publicados em que linhagens de *Salmonella* Enteritidis foram tipadas pela metodologia de ERIC-PCR (MILLEMANN et al., 1996; CHMIELEWSKI et al., 2002; SUH e SONG, 2006; OLIVEIRA et al., 2007; AMMARI et al., 2009). Já a metodologia de PFGE tem sido bastante utilizada na discriminação de linhagens de surtos e tem se mostrado como uma importante ferramenta na tipagem de linhagens de *S. Enteritidis* na maioria dos estudos (RIDLEY; THRELFALL; ROWE, 1998; AKTAS et al., 2007; CHU et al., 2009;

KANG et al., 2009; RIVOAL et al., 2009; KOBER et al., 2011; RAHMANI et al., 2013; SHARIAT et al., 2013; SON et al., 2013).

Em estudos realizados em outros locais do mundo, como os de Millemann e colaboradores (MILLEMANN et al., 1996) com 14 linhagens isoladas na França entre 1991 e 1993 e de Suh e Song (SUH; SONG, 2006) com 22 linhagens isoladas na Coréia do Sul entre 2001 e 2002, a técnica de ERIC-PCR demonstrou baixo poder de discriminação das linhagens, apresentando somente um perfil genotípico no primeiro estudo e dois no segundo. Entretanto, esses resultados podem estar relacionados ao curto período de isolamento das linhagens estudadas e/ou no caso do primeiro trabalho também a alguma falha metodológica, já que várias condições foram testadas e não foram descritas com detalhes no trabalho.

Similarmente aos nossos resultados (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012), ERIC-PCR foi eficiente em discriminar 31 linhagens isoladas na Polônia nos estudos de Chmielewski e colaboradores (CHMIELEWSKI et al., 2002), gerando 31 perfis diferentes, e também 15 linhagens isoladas em Marrocos entre 2005 e 2006 nos estudos de Ammari e colaboradores (AMMARI et al., 2009), sendo que neste último, ERIC-PCR apresentou um poder discriminatório maior do que a técnica de PFGE, considerada padrão ouro na tipagem molecular de *Salmonella* Enteritidis, discriminando as linhagens em seis perfis diferentes contra quatro perfis gerados por PFGE. Dessa forma ERIC-PCR demonstrou ser uma metodologia rápida e eficiente na tipagem de *S. Enteritidis*.

Pelo nosso conhecimento, além do nosso estudo (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012), somente um estudo utilizou ERIC-PCR na tipagem de linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Brasil. O estudo de Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2007) utilizou diferentes metodologias baseadas em sequências repetitivas (rep-PCR) para tipar linhagens de *S. Enteritidis* isoladas em alguns estados da região sul do Brasil. Nesse estudo, 102 linhagens isoladas de surtos entre 1995 e 2001 foram tipadas por REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR. Entretanto, essas metodologias não foram eficientes em discriminar as linhagens daquele estudo, o que pode ser explicado pelo fato de as linhagens terem sido isoladas somente de surtos em um período de tempo menor ao do presente estudo.

Nos estudos realizados com PFGE, Ridley e colaboradores (RIDLEY; THRELFALL; ROWE, 1998) utilizaram a metodologia de PFGE em comparação a ribotipagem e análise plasmidial para tipar 60 linhagens de *S. Enteritidis*. Nesse

estudo, os autores encontraram um grande potencial discriminatório de PFGE em comparação às outras duas técnicas utilizadas. Do mesmo modo, Aktas e colaboradores (AKTAS et al., 2007), ao tipar 26 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de casos clínicos de crianças verificaram que PFGE apresentou um grande poder discriminatório em comparação à análise plasmidial. Em contrapartida, Kober e colaboradores (KOBBER et al., 2011) ao tiparem 31 linhagens isoladas de diversas fontes no sul do Brasil, encontraram um índice de discriminação de 0,55 para PFGE e de 0,99 para a técnica de *fluorescent amplified fragment length polymorphism* (FAFLP), demonstrando que nesse caso, PFGE não foi uma boa ferramenta na discriminação das linhagens estudadas.

No Brasil, estudos que utilizaram PFGE para tipar linhagens de *S. Enteritidis* isoladas na região sul do país encontraram índice de discriminação moderados. No estudo de Kober e colaboradores (KOBBER et al., 2011) realizado com 31 linhagens isoladas de diversas fontes entre 1995 e 2001, o índice de discriminação de PFGE foi de 0,55. No estudo de Kottwitz e colaboradores (KOTTWITZ et al., 2011) realizado com 41 linhagens isoladas de fezes humanas e de alimentos entre 2002 e 2006 o índice de discriminação de PFGE foi de 0,66. Dessa forma, no presente estudo PFGE foi mais eficaz em discriminar linhagens de *S. Enteritidis* ($D=0,98$) do que os outros dois estudos realizados no Brasil mencionados acima (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

Devido aos resultados similares gerados por ambas as metodologias utilizadas no presente estudo, e a alta similaridade genotípica encontrada entre linhagens isoladas em um período de 24 anos, podemos inferir que a maioria das linhagens de *S. Enteritidis* estudadas devem descender de um ancestral comum que pouco se diferenciou ao longo de 24 anos e que têm infectado humanos e contaminado alimentos em surtos e casos esporádicos no Brasil (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012). Essa hipótese é reforçada pelos estudos de Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2003) e Kottwitz e colaboradores (KOTTWITZ et al., 2011) que encontraram uma alta clonalidade em linhagens isoladas após 1993 no Brasil.

Na tipagem das 60 linhagens isoladas de casos clínicos de frangos e do ambiente da granja, ERIC-PCR e PFGE também apresentaram poder discriminatório similar, sendo encontrado o valor de 0,93 para ERIC-PCR e de 0,90 para PFGE. Esses resultados similares corroboram com os resultados descritos acima na

tipagem de linhagens isoladas de humanos e alimentos onde ERIC-PCR e PFGE apresentaram índice de discriminação de 0,97 e 0,98, respectivamente. O alto poder discriminatório encontrado também nessas linhagens isoladas de frangos confirma o potencial dessas metodologias em diferenciar *S. Enteritidis* isoladas de diferentes fontes (CAMPIONI; ZOLDAN; FALCÃO, enviado para publicação).

O dendrograma concatenado de ERIC-PCR e PFGE agrupou as linhagens em dois grandes grupos denominados A e B (Figura 14). O grupo A consistiu de linhagens isoladas tanto de casos clínicos de frangos (23) quanto do ambiente da granja (5) com 81,2% de similaridade. O grupo B também consistiu de linhagens isoladas tanto de casos clínicos de frangos (21) quanto do ambiente da granja (11) com 81,1% de similaridade. A similaridade entre os dois grupos foi de 73,3% (CAMPIONI; ZOLDAN; FALCÃO, 2013).

Em ambos os grupos, algumas linhagens do ambiente da granja foram indistinguíveis das linhagens isoladas de casos clínicos de frangos. Essas linhagens foram isoladas de diferentes Estados brasileiros como São Paulo e Pernambuco e de diferentes regiões como Sudeste e Nordeste do Brasil. Ademais, nossos dados sugerem que o ambiente deve estar contaminando frangos na granja e mostra o propé dos funcionários como possíveis veículos de transmissão de *S. Enteritidis* dentro da granja (CAMPIONI; ZOLDAN; FALCÃO, enviado para publicação).

Interessante mencionar que no grupo A todas as linhagens, com exceção de uma, foram isoladas entre 2004 e 2006 enquanto no grupo B todas as linhagens, com exceção de uma, foram isoladas entre 2007 e 2010. As exceções foram a SE37/09 que foi isolada em 2009 e que está presente no grupo A e a SE387/06 que foi isolada em 2006 e que está presente no grupo B. Ademais, no grupo A observou-se uma alta prevalência de linhagens isoladas nas regiões Nordeste e Centro-oeste do Brasil (20/28), enquanto no grupo B observou-se uma alta prevalência de linhagens isoladas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (24/32) (CAMPIONI; ZOLDAN; FALCÃO, enviado para publicação).

Além do presente estudo, poucos estudos foram realizados no Brasil com linhagens de *S. Enteritidis* relacionadas a frangos (DOS SANTOS et al., 2003; NUNES et al., 2003; REZENDE et al., 2005; ALCOCER et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007; RIBEIRO; KELLERMANN; SANTOS, 2007; RIBEIRO et al., 2008; MEDEIROS et al., 2011; CAMPIONI; ZOLDAN; FALCÃO, 2013). Desses estudos, somente dois

utilizaram métodos moleculares na tipagem das linhagens (ALCOCER et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007)

Alcocer e colaboradores (ALCOCER et al., 2006) tiparam 18 linhagens de diferentes sorovariedades de *Salmonella* isoladas de carcaças de frangos entre 1999 e 2000 no Sul do Brasil por fagotipagem, REP-PCR e ERIC-PCR. Todas as 18 linhagens de *S. Enteritidis* foram pertencentes ao fagotipo 4 e apresentaram o mesmo perfil de ERIC e REP-PCR, mostrando um alto grau de similaridade genotípica.

Similarmente, no estudo de Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2007), 111 linhagens de *S. Enteritidis*, sendo 43 relacionadas a frangos, isoladas na região sul do Brasil entre 1995 e 2001, quatro fagotipos diferentes foram identificados e um alto nível de similaridade das linhagens foi observado quando tipadas por REP-PCR, ERIC-PCR e BOX-PCR.

Com relação a estudos realizados em outras partes do mundo, Kim e colaboradores (KIM et al., 2008) encontraram uma similaridade maior do que 80% entre 66 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos e de frangos entre 1994 e 2002 na Coréia, utilizando a metodologia de PFGE. Os autores sugeriram que os frangos têm sido fonte de contaminação de humanos na Coréia. Em contraste, Chmielewski e colaboradores (CHMIELEWSKI et al., 2002) e Yang e colaboradores (YANG et al., 2010) encontraram uma alta diversidade entre linhagens de *S. Enteritidis* tipadas por ERIC-PCR e PFGE, respectivamente. No estudo de Chmielewski e colaboradores (CHMIELEWSKI et al., 2002), os resultados agruparam 31 *S. Enteritidis* relacionadas a frangos isoladas na Polônia em três grupos genômicos diferentes com uma similaridade máxima de 60%. No estudo de Yang e colaboradores (YANG et al., 2010), os resultados de PFGE apresentaram um grupo de 109 linhagens isoladas principalmente de carne de frango em várias cidades da China entre 2007 e 2008, divididas em 52 PFGE tipos com uma similaridade de 55%.

A tipagem por MLVA foi realizada nas 188 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, alimentos e de frangos no Brasil e comparadas com 100 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas na América do Norte de humanos e de frangos (CAMPIONI et al., 2013).

Essas 288 linhagens foram divididas em dois grandes grupos denominados MLVA-A e MLVA-B (Figura 15). O grupo MLVA-A apresentou 71 linhagens isoladas

na América do Norte e somente três linhagens isoladas no Brasil. Essas linhagens do Brasil incluíram as isoladas antes do início da pandemia de *S. Enteritidis* se iniciar no Brasil, a SE4 isolada em 1986 e a SE5 isolada em 1992, e também, uma linhagem isolada após o início da pandemia, a SE100 isolada em 1998. Em contraste, o grupo B agrupou 185 linhagens isoladas no Brasil e 29 linhagens isoladas na América do Norte (CAMPIONI et al., 2013).

A distribuição das linhagens nos grupos não apresentou correlação com a fonte ou o ano de isolamento, o que já havia sido verificado nas outras metodologias utilizadas nesse estudo. As linhagens presentes no grupo A, foram divididas em 34 tipos genéticos diferentes com similaridade maior do que 46% entre elas, enquanto no grupo B as linhagens se diferenciaram em 15 tipos genéticos diferentes com mais de 66% de similaridade. Esses resultados sugerem que as linhagens do grupo A foram mais geneticamente diversas, enquanto as linhagens do grupo B apresentaram um alto grau de similaridade (CAMPIONI et al., 2013).

Interessante ressaltar que as duas linhagens isoladas no Brasil antes do início da pandemia (SE4 e SE5) foram agrupadas no grupo A. Nesse mesmo grupo, também ficou agrupada uma linhagem pré-pandêmica isolada nos Estados Unidos em 1986 (Pu50). Apesar de o presente estudo apresentar poucas linhagens isoladas pré-pandemia, o agrupamento dessas três linhagens sugere que possivelmente as linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Brasil eram mais geneticamente diversas até 1992. Além disso, provavelmente após o início da pandemia em 1993, um novo subtipo dessa sorovariedade foi introduzido no Brasil e tem sido o subtipo prevalente isolado de surtos e de casos esporádicos com pouca variação genética durante as últimas duas décadas (CAMPIONI et al., 2013).

Em contraste, nossos dados sugerem que múltiplos subtipos de *S. Enteritidis* têm sido constantemente isolados na América do Norte, o que é demonstrado pelo expressivo número de isolados presentes nos dois grupos (71 grupo A e 29 grupo B) (CAMPIONI et al., 2013).

Pelo nosso conhecimento, não existem estudos onde linhagens isoladas no Brasil foram tipadas por MLVA. Dessa forma, não temos como comparar nossos resultados com outros desse país (CAMPIONI et al., 2013). Entretanto, Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2003) utilizando a metodologia de fagotipagem em linhagens isoladas entre 1975 e 1995 no Estado de São Paulo, verificou que as linhagens circulantes antes de 1993 pertenciam majoritariamente ao fagotipo 8,

enquanto as isoladas após 1993 pertenciam majoritariamente ao fagotipo 4. Esses autores também verificaram que as linhagens do fagotipo 4 apresentaram um alto grau de homogeneidade em comparação às linhagens do fagotipo 8 quando tipadas por ribotipagem.

Nos Estados Unidos, Patrick e colaboradores (PATRICK et al., 2004) analisaram os fagotipos de *S. Enteritidis* isolados entre 1985 e 1999 e mostraram que a proporção de surtos causados pelos fagotipos 8 e 13 diminuíram enquanto o número de isolados do fagotipo 4 aumentaram durante esse período. Os autores também demonstraram que houve uma diferença nos fagotipos isolados de acordo com a região geográfica do país analisada. No Nordeste e no Sul o fagotipo 8 foi o mais comumente isolado de surtos seguido pelo fagotipo 13a. Esses fagotipos foram também os mais comuns no Centro-oeste, enquanto o fagotipo 4 foi mais predominante na região Oeste. No Canadá, Nesbitt e colaboradores (NESBITT et al., 2012) verificaram que os fagotipos 8, 13 e 4 foram os três mais isolados de linhagens de *S. Enteritidis* entre 2003 e 2009, correspondendo a 62% dos isolados de casos humanos.

Os estudos acima reforçam a hipótese de o alto grau de clonalidade encontrado nas linhagens isoladas no Brasil após 1993 ser devido a possível predominância do fagotipo 4. Por outro lado, a grande diversidade encontrada em linhagens da América do Norte deve estar correlacionada à presença de diferentes fagotipos (CAMPIONI et al., 2013). Entretanto, é importante mencionar que linhagens de um mesmo fagotipo podem apresentar diferentes perfis de MLVA (MALORNY; JUNKER; HELMUTH, 2008; BERANEK et al., 2009; SHAH et al., 2011a; SHAH et al., 2011b).

A técnica de *Multi-locus sequence typing* (MLST) tem sido utilizada para análises evolutivas e de populações, estimando taxas de recombinação e mutação em genes *housekeeping* de linhagens pertencentes a um mesmo gênero (NODA et al., 2011).

Pelo nosso conhecimento, existem poucos estudos utilizando-se a metodologia de MLST na tipagem de linhagens de *Salmonella* Enteritidis (TORPDAHL et al., 2005; IKUMAPAYI et al., 2007; LITRUP et al., 2010; NODA et al., 2011).

Torpdahl e colaboradores (TORPDAHL et al., 2005) em um estudo com 110 linhagens de *Salmonella enterica* isoladas na Dinamarca entre 1995 e 2001, observou que as 10 linhagens da sorovariedade Enteritidis pertenciam ao ST 11.

Ikumapayi e colaboradores (IKUMAPAYI et al., 2007), em estudo com 62 linhagens isoladas em Gambia, pertencentes a diversas sorovariedades de *S. enterica*, tipou todos os 50 isolados da sorovariedade Enteritidis como ST 11.

No estudo de Litrup e colaboradores (LITRUP et al., 2010), também com diversas sorovariedades de *S. enterica* isoladas na Dinamarca, foram encontradas nove das 10 linhagens de *S. Enteritidis* estudadas pertencentes ao ST 11. A outra sorovariedade pertencia ao ST 310.

O estudo de Noda e colaboradores (NODA et al., 2011) é o único de MLST publicado até o momento realizado somente com linhagens da sorovariedade Enteritidis. Nesse estudo com 30 linhagens dessa sorovariedade isoladas no Japão entre 1973 e 2004, foi visto que todas elas pertenciam ao ST 11. Essas linhagens, apesar de pertencerem ao mesmo ST, apresentaram diferentes perfis de PFGE e diferentes fagotipos.

No Brasil, pelo nosso conhecimento, não existem artigos publicados onde se utilizou a metodologia de MLST na tipagem de linhagens de *Salmonella* Enteritidis. O banco de dados de *Salmonella enterica* possuía, antes do presente estudo, somente uma linhagem da sorovariedade Enteritidis isolada no Brasil. Essa linhagem pertence ao ST 6, porém ela não foi inserida por um grupo de pesquisa brasileiro. Dessa forma, estudos onde se utilize essa metodologia são de grande importância para que linhagens isoladas no Brasil possam ser inseridas no banco de dados e então comparadas a linhagens de diversos locais do mundo evidenciando suas possíveis relações epidemiológicas.

O presente estudo foi realizado com 188 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos, de alimentos e de frangos entre 1986 e 2010 no Brasil. Dessas 188 linhagens, 46 foram escolhidas para a tipagem por MLST. Essas linhagens foram representantes de cada ano do período estudado, bem como, foram escolhidas linhagens isoladas tanto de humanos quanto de alimentos e de frangos.

Das 46 linhagens estudadas, 44 foram tipadas como sendo ST 11. Esse ST é o que possui o maior número de linhagens da sorovariedade Enteritidis (207 do total de 304). Nossos dados corroboram com os dos estudos acima citados que também encontraram o ST 11 como sendo o predominante entre as linhagens de *S.*

Enteritidis. Entretanto, duas linhagens do nosso estudo apresentaram alelos que não existiam no banco de dados de *S. enterica*. Especificamente, a linhagem SE 231 apresentou um novo alelo (307) do gene *hemD* gerando o ST1632 e a linhagem SE 11 apresentou um novo alelo (390) do gene *sucA* e gerou o ST 1633 (Figura 20). Dessa forma, nosso estudo incluiu no banco de dados dois novos STs de *Salmonella* Enteritidis, *single locus variant* do ST 11.

A metodologia de MLST não apresentou um bom índice de discriminação das linhagens do presente estudo ($D=0,11$) e dessa forma, não separou as linhagens em tipos específicos de acordo com o período de isolamento. Entretanto, caracterizou dois novos STs que ainda não haviam sido descritos nas linhagens de *Salmonella* Enteritidis presentes no banco de dados do MLST.

No diagrama gerado com todas as linhagens de *Salmonella enterica* existentes no banco de dados, foi possível verificar os STs e os complexos clonais com maior número de linhagens. Os principais complexos clonais foram analisados individualmente e, foi observado que usualmente as sorovariedades são altamente clonais, pois no geral cada complexo clonal é representado por uma sorovariedade predominante. Tal fato foi verificado também no estudo de Achtman e colaboradores (ACHTMAN et al., 2012).

Interessante mencionar que, no complexo clonal (CC) 11 há uma predominância de duas sorovariedades (Enteritidis e Gallinarum). Apesar de essas sorovariedades estarem no mesmo CC, elas estão representadas por STs diferentes, ou seja, a maioria das linhagens da sorovariedade Enteritidis pertence ao ST11 e a maioria das linhagens da sorovariedade Gallinarum pertence ao ST92. Dessa forma, há uma separação clara dessas sorovariedades em STs distintos. Entretanto, essas sorovariedades possuem uma relação filogenética, pois são *single locus variant*. Isso sugere que essas duas sorovariedades têm uma relação genética mais próxima do que com outras sorovariedades alocadas em outros complexos clonais.

O presente estudo permitiu por MLST uma análise da diversidade genética das linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Brasil com outras linhagens isoladas em diversos locais do mundo. Os resultados do MLST confirmaram os obtidos por ERIC-PCR e PFGE nesse trabalho, em que foi observado que essa sorovariedade é muito monomórfica, visto que 44 das 46 linhagens isoladas ao longo de 24 anos

pertenceram ao mesmo ST e também confirmam dados da literatura (MARTINS et al., 2006; ACHTMAN, 2008; HOLT et al., 2008).

Dessa forma, o presente estudo contribuiu para uma inserção significativa de linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Brasil no banco de dados mundial de MLST, pois anteriormente a esse estudo havia apenas uma única representante de *S. Enteritidis* do ST 6 isolada no país. Ademais, duas das nossas linhagens geraram dois novos STs ainda não descritos no banco de dados. Tais resultados deverão incluir efetivamente o Brasil na epidemiologia mundial de *S. enterica* por MLST.

Frente aos resultados obtidos na tipagem das linhagens com as diferentes metodologias utilizadas nesse projeto, verificamos que apesar de a metodologia de MLVA ter diferenciado as linhagens isoladas no Brasil em menos subtipos do que ERIC-PCR e PFGE, a primeira metodologia permitiu conclusões epidemiológicas mais claras do que as obtidas pelas outras duas metodologias. Entretanto, ERIC-PCR e PFGE foram mais eficazes em diferenciar as linhagens estudadas. A metodologia de MLST demonstrou baixo potencial discriminatório, entretanto as análises das linhagens do banco de dados demonstraram que essa metodologia é eficaz em diferenciar as sorovariedades de *Salmonella* em STs sorovariedade-específicos.

O uso de antimicrobianos usualmente não é recomendado no tratamento de salmoneloses em geral. Entretanto, em alguns casos a infecção pode evoluir para casos severos de infecção como bacteremia ou meningite. Nesses casos, o uso de antimicrobianos é essencial. A resistência a antimicrobianos nas linhagens do presente estudo foi analisada frente a algumas drogas recomendadas pelo CLSI para tratar infecções por *Salmonella*. O antimicrobiano mais comum utilizado na área veterinária tem sido o ácido nalidíxico, uma quinolona que tem como alvo a DNA girase (STEVENSON et al., 2007; NĂȘCUȚIU, 2012). No Brasil, as quinolonas foram proibidas em 2009 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) de serem utilizadas em ração animal como promotores de crescimento. Entretanto, esses antimicrobianos são legalmente utilizados em produtos veterinários utilizados para tratamento dos animais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2013).

No estudo de De Castro e colaboradores (DE CASTRO et al., 2002) realizado com 128 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Estado de São Paulo entre 1985 e 1999, os autores encontraram resistência ao ácido nalidíxico em 0,8% das linhagens

e a sulfametoxazol-trimetoprima em 8,6% das linhagens estudadas. Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2003) em um estudo com 105 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas entre 1975 e 1995 encontrou resistência ao ácido nalidíxico em 20,9% das linhagens, a estreptomicina em 40,9% e ao sulfametoxazol-trimetoprima em 3,8% das linhagens estudadas.

Resultados similares foram encontrados em linhagens isoladas na região Sul do Brasil. Em um estudo com 79 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas entre 2001 e 2002, Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2007) encontraram resistência ao ácido nalidíxico em 21,5% das linhagens estudadas e resistência ao sulfametoxazol-trimetoprima em 13,9% das linhagens estudadas. Kottwitz e colaboradores (KOTTWITZ et al., 2011) em um estudo com 41 linhagens isoladas entre 2002 e 2006 encontrou resistência ao ácido nalidíxico em 41,5% das linhagens estudadas.

Estudos com linhagens isoladas em outras partes do mundo também mostraram resistência das linhagens de *S. Enteritidis* a esses antimicrobianos (SUH; SONG, 2006; SJÖLUND-KARLSSON et al., 2010; HUR et al., 2011; KOZODEROVIĆ et al., 2011; LU et al., 2011; THONG; LAI; DHANOA, 2011; NESBITT et al., 2012; ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al., 2012).

Nesse estudo, 42,5% das 188 linhagens de *S. Enteritidis* isoladas de humanos (67), alimentos (61) e animais (60) apresentaram resistência ao ácido nalidíxico e somente 0,5% das linhagens foi resistente ao sulfametoxazol-trimetoprima e estreptomicina. A resistência a esses antimicrobianos foi observada nas linhagens isoladas a partir de 1996 no Brasil, e o aumento de linhagens resistentes sugere o uso de quinolonas em frangos no Brasil.

O principal mecanismo de resistência a quinolonas tem sido associado a alteração do sítio de ligação do antibiótico através de mutações no gene *gyrA* e também a bomba de efluxo e genes plasmidiais (LIEBANA et al., 2002; TAMANG et al., 2011; NĂȘCUȚIU, 2012).

No presente estudo, não foram encontrados a maioria dos genes plasmidiais nem o gene codificante para a bomba de efluxo. O único gene plasmidial encontrado em duas linhagens (SE107/09 e SE191/10), foi o *qnrB*. Entretanto, essas linhagens também apresentaram mutações no gene *gyrA* e quando comparadas às outras do mesmo perfil porém *qnrB* negativas, os valores de CIM se mostraram similares ao das *qnrB* positivas. Dessa forma, podemos inferir que a resistência a quinolonas e a susceptibilidade reduzida a fluoroquinolonas nas linhagens estudadas está

relacionada principalmente às mutações do gene *gyrA* e não a presença do gene *qnrB*. As mutações do gene *gyrA* encontradas foram a substituição dos aminoácidos serina97 por prolina97, serina83 por fenilalanina83, ácido aspártico87 por asparagina87 e ácido aspártico87 por tirosina87.

Tamang e colaboradores (TAMANG et al., 2011) em estudo com linhagens de *Salmonella* isoladas na Coreia, também não encontraram genes plasmidiais nem o gene codificante da bomba de efluxo, sendo a resistência relacionada principalmente a pontos de mutação do gene *gyrA*. As mutações que levaram a resistência ao ácido nalidíxico, ocorreram em algumas linhagens no códon 87 e em outras no códon 83, sendo a mutação mais frequente a troca da Asp87 por Tyr87. Essa mutação foi a mais encontrada nas linhagens do presente estudo, onde 51 das 80 linhagens resistentes ao ácido nalidíxico substituíram Asp87 por Tyr87 (TAMANG et al., 2011).

Por outro lado, Liebana e colaboradores (LIEBANA et al., 2002) em estudo com 100 linhagens de *Salmonella* isoladas de animais na Inglaterra encontraram como mais frequente a troca do aminoácido Asp87 por Asn87, sendo no presente estudo a terceira mutação mais frequente (13 linhagens de 80) (item 4.6.2 e Tabela 9).

As diferenças na prevalência de uma mutação ou outra podem estar relacionadas a variações geográficas da origem dos isolados, variação nas práticas utilizadas em animais ou então na variação do uso do antimicrobiano utilizado (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

Com relação aos genes de virulência pesquisados, a maioria das linhagens estudadas (98,4%) apresentou todos os genes pesquisados. As duas linhagens (SE75 e SE183) que não apresentaram o gene *prot6E*, provavelmente possuem alguma mutação nesse gene que não permitiu aos *primers* hibridarem, uma vez que esse gene é plasmidial e as duas linhagens foram positivas para o gene plasmidial *spvB* (Campioni et al., 2012).

A alta frequência dos genes de virulência pesquisados reforça o potencial patogênico das linhagens de *S. Enteritidis* estudadas que têm infectado humanos e frangos ao longo de 24 anos no Brasil (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

Resultados similares quanto à alta prevalência de alguns genes de virulência em linhagens de *S. Enteritidis* isoladas da América do Norte e África (DIONE et al., 2011; SHAH et al., 2011a; ZOU; KEELARA; THAKUR, 2012).

Os resultados de tipagem molecular por ERIC-PCR, PFGE e MLVA obtidos no presente estudo demonstraram uma alta similaridade genotípica entre linhagens de *S. Enteritidis* isoladas no Brasil, o que sugere que as linhagens estudadas descendem de um precursor comum que pouco se diferenciou genotipicamente ao longo de 24 anos no Brasil (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012; CAMPIONI et al., 2013). Ademais, os resultados de MLVA sugerem que um novo e prevalente subtipo foi introduzido no Brasil após 1993 e tem contaminado alimentos e infectado humanos e animais (CAMPIONI et al., 2013). O grande número de genes de virulência encontrados reforça o potencial das mesmas causarem doenças em humanos e animais, bem como, os riscos de sua presença em alimentos. Ademais, a grande porcentagem de linhagens resistentes ao ácido nalidíxico observadas a partir de 1996 sugere o uso de quinolonas no tratamento de infecções em animais causadas por *S. Enteritidis* no Brasil (CAMPIONI; BERGAMINI; FALCÃO, 2012; CAMPIONI; ZOLDAN; FALCÃO, enviado para publicação).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1- A grande prevalência de genes de virulência nas linhagens de *Salmonella* Enteritidis de origens diversas estudadas reforça o potencial das mesmas causarem doenças em humanos e animais, bem como, os riscos de sua presença em alimentos.

6.2- A grande porcentagem de linhagens resistentes ao ácido nalidíxico observadas a partir de 1996 sugere o uso de quinolonas no tratamento de infecções por *S. Enteritidis* no Brasil.

6.3- Pontos de mutação no gene *gyrA* foram o principal mecanismo de resistência a quinolonas e susceptibilidade reduzida a fluoroquinolonas observados nas linhagens estudadas.

6.4- Os dados de ERIC-PCR e PFGE sugerem que as linhagens de *S. Enteritidis* estudadas descendem de um precursor comum que pouco se diferenciou genotipicamente ao longo de 24 anos no Brasil e que tem contaminado alimentos e infectado humanos e animais.

6.5- A alta similaridade genotípica entre linhagens isoladas de frangos e do ambiente da granja por ERIC-PCR e PFGE, sugerem o ambiente como importante fonte de contaminação de frangos por *S. Enteritidis* no Brasil e vice-versa.

6.6- As análises de MLST demonstraram que o ST 11 é o principal ST da sorovariedade Enteritidis no banco de dados de *Salmonella enterica*, ao qual pertenceram a maioria das linhagens estudadas, bem como, a maioria das linhagens isoladas em outros locais do mundo.

6.7- Os resultados de MLVA sugerem que um novo e prevalente subtipo de *S. Enteritidis* que pouco se diferenciou geneticamente foi introduzido no Brasil após 1993 que esse tem sido o subtipo prevalente isolado durante as últimas duas décadas no país. Ademais, linhagens isoladas na América do Norte parecem ser mais diversificadas com a possibilidade de mais de um subtipo prevalente.

6.8- Apesar de a metodologia de MLVA ter diferenciado as linhagens isoladas no Brasil em menos subtipos do que ERIC-PCR e PFGE, a primeira metodologia permitiu conclusões epidemiológicas mais claras do que as obtidas pelas outras duas metodologias. Entretanto, ERIC-PCR e PFGE foram mais eficazes em diferenciar as linhagens estudadas. Já MLST foi mais eficiente em agrupar linhagens em STs sorovariedade-específicos.

REFERÊNCIAS

ACHTMAN, M. Evolution, population structure, and phylogeography of genetically monomorphic bacterial pathogens. **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 53-70, 2008. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18785837> >.

ACHTMAN, M. et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002776, 2012. ISSN 1553-7374. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22737074> >.

AGBOR, T. A.; MCCORMICK, B. A. *Salmonella* effectors: important players modulating host cell function during infection. **Cell Microbiology**, v. 13, n. 12, p. 1858-69, Dec 2011. ISSN 1462-5822. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21902796> >.

AGRON, P. G. et al. Identification by subtractive hybridization of sequences specific for *Salmonella enterica* serovar enteritidis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 11, p. 4984-91, Nov 2001. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11679316> >.

AKTAS, Z. et al. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 6, p. 541-5, Dec 2007. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17900873> >.

ALCAINE, S. D.; WARNICK, L. D.; WIEDMANN, M. Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella*. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 3, p. 780-90, Mar 2007. ISSN 0362-028X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17388077> >.

ALCOCER, I. et al. Discriminação de sorovares de *Salmonella* spp. isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e Fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 414-420, 2006.

ALTEKRUSE, S. F.; COHEN, M. L.; SWERDLOW, D. L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Disease**, v. 3, n. 3, p. 285-93, 1997 Jul-Sep 1997. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9284372> >.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, n. 3, p. 281-7, Feb 2012. ISSN 1879-3460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22208955> >.

AMMARI, S. et al. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from foods and patients in northern Morocco. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 9, p. 695-703, 2009. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19858571> >.

ANGULO, F. J. et al. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals.

Microbial Drug Resistance, v. 6, n. 1, p. 77-83, 2000. ISSN 1076-6294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10868811> >.

BAKOWSKI, M. A. et al. SopD acts cooperatively with SopB during *Salmonella* enterica serovar Typhimurium invasion. **Cell Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 2839-55, Dec 2007. ISSN 1462-5814. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17696999> >.

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

BENDER, J. B. et al. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella* enterica serotype typhimurium. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 3, p. 189-95, Jan 2001. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11172141> >.

BERANEK, A. et al. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis for subtyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 1, p. 43-51, Jan 2009. ISSN 1618-0607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18706857> >.

BERTRAND, S. et al. Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 8, p. 2897-903, Aug 2006. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16891509> >.

BLONDEL, C. J. et al. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes Gallinarum and Enteritidis. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11724, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20661437> >.

BORREGO, J. J. et al. Comparison of epidemiological markers of *Salmonella* strains isolated from different sources in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 12, p. 3058-64, Dec 1992. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1452685> >.

BOTTELDOORN, N. et al. Limited genetic diversity and gene expression differences between egg- and non-egg-related *Salmonella* Enteritidis strains. **Zoonoses Public Health**, v. 57, n. 5, p. 345-57, Aug 2010. ISSN 1863-2378. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486501> >.

BOXRUD, D. et al. Comparison of multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 536-43, Feb 2007. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17151203> >.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-7, Jul 2000. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10878026> >.

CAFFER, M. I.; EIGUER, T. *Salmonella* enteritidis in Argentina. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 1-2, p. 15-9, Jan 1994. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8155472> >.

CAMPIONI, F. et al. MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among *S. Enteritidis* strains isolated from food, humans and chickens in Brazil in comparison to the North American Strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 174-81, Mar 2013. ISSN 1879-3460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416553> >.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A. M.M.; FALCÃO, J. P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 254-64, Dec 2012. ISSN 1095-9998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986188> >.

CAO, S. Y. et al. Comparative analysis of intestinal microbial community diversity between healthy and orally infected ducklings with *Salmonella* enteritidis by ERIC-PCR. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 7, p. 1120-5, Feb 2008. ISSN 1007-9327. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18286697> >.

CHENG, J. et al. Detection of hemi/homozygotes through heteroduplex formation in high-resolution melting analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 410, n. 1, p. 158-60, Mar 2011. ISSN 1096-0309. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21111703> >.

CHMIELEWSKI, R. et al. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella* Enteritidis isolates from Poland. **Journal of Veterinary Medicine B Infectious Disease and Veterinary Public Health**, v. 49, n. 4, p. 163-8, May 2002. ISSN 0931-1793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12069267> >.

CHOI, S. H. et al. Increasing incidence of quinolone resistance in human non-typhoid *Salmonella enterica* isolates in Korea and mechanisms involved in quinolone resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1111-4, Dec 2005. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16244086> >.

CHU, C. et al. Genotyping, plasmid analysis, and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from humans and chickens in central Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 108, n. 10, p. 765-71, Oct 2009. ISSN 0929-6646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19864196> >.

CLAVIJO, R. I. et al. Identification of genes associated with survival of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chicken egg albumen. **Applied Environmental**

Microbiology, v. 72, n. 2, p. 1055-64, Feb 2006. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461649> >.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2012.

COBURN, B.; GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. *Salmonella*, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 112-8, 2007 Feb-Mar 2007. ISSN 0818-9641. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17146467> >.

CROSA, J. H. et al. Molecular relationships among the *Salmonelleae*. **Journal of Bacteriology**, v. 115, n. 1, p. 307-15, Jul 1973. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4717519> >.

DE CASTRO, F. A. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v. 6, n. 5, p. 244-51, Oct 2002. ISSN 1413-8670. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12495606> >.

DIONE, M. M. et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal *Salmonella* isolates in The Gambia and Senegal. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 11, p. 765-75, Nov 2011. ISSN 1972-2680. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22112729> >.

DOS SANTOS, L. R. et al. Phage types of *Salmonella* enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 45, n. 1, p. 1-4, 2003 Jan-Feb 2003. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12751314> >.

FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K.; LOGUE, C. M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of pulsed-field gel electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2215-9, May 2005. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15872244> >.

FERNANDES, S. A. et al. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003 Mar-Apr 2003. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12754568> >.

FERNANDES, S. A. et al. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-84, 2006 Jul-Aug 2006. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17119671> >.

FICA, A. et al. *Salmonella* enteritidis, an emergent pathogen in Chile. **Revista Medica de Chile**, v. 125, n. 5, p. 544-51, May 1997. ISSN 0034-9887. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9497575> >.

FIGUEIRA, R. et al. Identification of *Salmonella* pathogenicity island-2 type III secretion system effectors involved in intramacrophage replication of *S. enterica* serovar typhimurium: implications for rational vaccine design. **MBio**, v. 4, n. 2, p. e00065, 2013. ISSN 2150-7511. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23592259> >.

FOREST, C. G. et al. Intracellular survival of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human macrophages is independent of *Salmonella* pathogenicity island (SPI)-2. **Microbiology**, v. 156, n. Pt 12, p. 3689-98, Dec 2010. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817644> >.

GANTOIS, I. et al. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 718-38, Jul 2009. ISSN 1574-6976. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19207743> >.

GHILARDI, A. C.; TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulse types of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 3, p. 281-6, May 2006. ISSN 0074-0276. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16862323> >.

GOVINDEN, U. et al. Detection of mutations in the *gyrA* of clinical *Salmonella* spp. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 16, p. 3911-3914, 2009.

GRASSL, G. A.; FINLAY, B. B. Pathogenesis of enteric *Salmonella* infections. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 24, n. 1, p. 22-6, Jan 2008. ISSN 1531-7056. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18043228> >.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26-9, 2010 Jan-Feb 2010. ISSN 1769-7123. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840847> >.

HADJINICOLAOU, A. V. et al. Molecular beacon-based real-time PCR detection of primary isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis in environmental and clinical samples. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 97, 2009. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19454003> >.

HELMS, M. et al. Excess mortality associated with antimicrobial drug-resistant *Salmonella* typhimurium. **Emerging Infectious Disease**, v. 8, n. 5, p. 490-5, May 2002. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11996684> >.

HELMUTH, R.; SCHROETER, A. Molecular typing methods for *S. enteritidis*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 1-2, p. 69-77, Jan 1994. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7908822> >.

HENDRIKSEN, R. **A global Salmonella surveillance and laboratory support project of the World Health Organization**. 4th. 2003.

HENDRIKSEN, R. S. et al. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 8, p. 887-900, Aug 2011. ISSN 1556-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21492021> >.

HICKMAN-BRENNER, F. W.; STUBBS, A. D.; FARMER, J. J. Phage typing of *Salmonella* enteritidis in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 12, p. 2817-23, Dec 1991. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1757554> >.

HOFER, E.; DOS REIS, E. M. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 36, n. 1, p. 7-9, 1994 Jan-Feb 1994. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7997777> >.

HOLT, K. E. et al. High-throughput sequencing provides insights into genome variation and evolution in *Salmonella* Typhi. **Nature Genetics**, v. 40, n. 8, p. 987-93, Aug 2008. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660809> >.

HOPKINS, K. L. et al. Standardisation of multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) for subtyping of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Euro Surveillance**, v. 16, n. 32, 2011. ISSN 1560-7917. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871223> >.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 504-9, Jun 2004. ISSN 1740-1526. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15152206> >.

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. 2465-6, Nov 1988. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3069867> >.

HUR, J. et al. Antimicrobial resistance, virulence-associated genes, and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolated from piglets with diarrhea in Korea. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 75, n. 1, p. 49-56, Jan 2011. ISSN 0830-9000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21461195> >.

HÖLZER, S. U.; HENSEL, M. Divergent roles of *Salmonella* pathogenicity island 2 and metabolic traits during interaction of *S. enterica* serovar typhimurium with host cells. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33220, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427996> >.

IKUMAPAYI, U. N. et al. Molecular epidemiology of community-acquired invasive non-typhoidal *Salmonella* among children aged 2-29 months in rural Gambia and discovery of a new serovar, *Salmonella enterica* Dingiri. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. Pt 11, p. 1479-84, Nov 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965348> >.

IRINO, K. et al. Progression of *Salmonella* enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 3, p. 193-6, 1996 May-Jun 1996. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9163983> >.

JACOBY, G. A. et al. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1665-6, Apr 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164145> >.

JEONG, H. S. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and mutations in the gyrase and topoisomerase IV genes in *Salmonella* isolated from 12 tertiary-care hospitals in Korea. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 4, p. 551-7, Dec 2011. ISSN 1931-8448. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830947> >.

JONES, B. D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella* typhimurium initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, n. 1, p. 15-23, Jul 1994. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8006579> >.

KANG, Z. W. et al. Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella* enteritidis isolated from chickens and humans in Korea. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 71, n. 11, p. 1433-8, Nov 2009. ISSN 0916-7250. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19959892> >.

KAUFFMANN, F. **The bacteriology of Enterobacteriaceae** Copenhagen: Munksgaard: 1966.

KILIC, A. et al. Analysis of an outbreak of *Salmonella* enteritidis by repetitive-sequence-based PCR and pulsed-field gel electrophoresis. **Internal Medicine**, v. 49, n. 1, p. 31-6, 2010. ISSN 1349-7235. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20045998> >.

KILMARTIN, D. et al. Clonal expansion may account for high levels of quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar enteritidis. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2587-91, May 2005. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15870349> >.

KIM, H. B. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 639-45, Feb 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19064896> >.

- KIM, S. H. et al. Phage types and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolated from humans and chickens. **Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p. 209-13, Apr 2008. ISSN 1225-8873. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18545971> >.
- KOBER, M. V. et al. Differentiation of *Salmonella enteritidis* isolates by fluorescent amplified fragment length polymorphism. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 1, p. 19-26, Jan 2011. ISSN 1556-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932084> >.
- KOTETISHVILI, M. et al. Multilocus sequence typing for characterization of clinical and environmental *Salmonella* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1626-35, May 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11980932> >.
- KOTTWITZ, L. B. et al. Molecular characterization and resistance profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 strains isolated in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. Pt 7, p. 1026-31, Jul 2011. ISSN 1473-5644. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459909> >.
- KOZODEROVIĆ, G. et al. Molecular typing and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry, food, and humans in Serbia. **Folia Microbiologica**, v. 56, n. 1, p. 66-71, Jan 2011. ISSN 1874-9356. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394475> >.
- KRUY, S. L.; VAN CUYCK, H.; KOECK, J. L. Multilocus variable number tandem repeat analysis for *Salmonella enterica* subspecies. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease**, v. 30, n. 4, p. 465-73, Apr 2011. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21153561> >.
- LACONCHA, I. et al. Genotypic characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, n. 2, p. 155-65, Jul 2000. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889406> >.
- LACONCHA, I. et al. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 40, n. 1-2, p. 27-34, Mar 1998. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9600607> >.
- LE MINOR, L.; VÉRON, M.; POPOFF, M. A proposal for *Salmonella* nomenclature. **Annals of Microbiology**, v. 133, n. 2, p. 245-54, 1982 Sep-Oct 1982. ISSN 0300-5410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7149525> >.
- LEE, H. Y. et al. High rate of reduced susceptibility to ciprofloxacin and ceftriaxone among nontyphoid *Salmonella* clinical isolates in Asia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2696-9, Jun 2009. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19332677> >.

- LI, J. et al. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 91, n. 7, p. 2552-6, Mar 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8146152> >.
- LIEBANA, E. et al. Comparison of gyrA mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1481-6, Apr 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923377> >.
- LIEBANA, E. et al. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 154-61, Jan 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136764> >.
- LILIC, M.; QUEZADA, C. M.; STEBBINS, C. E. A conserved domain in type III secretion links the cytoplasmic domain of InvA to elements of the basal body. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. Pt 6, p. 709-13, Jun 2010. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516623> >.
- LINDSTEDT, B. A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis**, v. 26, n. 13, p. 2567-82, Jun 2005. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937984> >.
- LITRUP, E. et al. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica*. **Infection Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 1132-9, Oct 2010. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656064> >.
- LU, Y. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from chicken in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 1, p. 45-53, Jan 2011. ISSN 1556-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21083518> >.
- LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525-9, Jul 1992. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1624445> >.
- MAGALHÃES, V. et al. Pulsed field gel eletrophoresis use in bacteriology - a technical review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.
- MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140-5, Mar 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501229> >.

- MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Disease**, v. 50, n. 6, p. 882-9, Mar 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20158401> >.
- MALORNY, B.; JUNKER, E.; HELMUTH, R. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 84, 2008. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18513386> >.
- MARCUS, S. L. et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 145-56, Feb 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742687> >.
- MARTINS, C. et al. Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**, v. 42, p. 19-23, 2006.
- MATSUOKA, D. M. et al. A nosocomial outbreak of *Salmonella* enteritidis associated with lyophilized enteral nutrition. **Journal of Hospital Infection**, v. 58, n. 2, p. 122-7, Oct 2004. ISSN 0195-6701. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474183> >.
- MEDEIROS, M. A. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-60, Dec 2011. ISSN 1680-5348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358402> >.
- MILLEMANN, Y. et al. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 14, n. 2-3, p. 129-34, Jun 1996. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809548> >.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibmlink.php?numlink=211608>). Acessado em 8 de agosto de 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Análise epidemiológica de surtos. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf. 2011>.
- MISHU, B. et al. Outbreaks of *Salmonella* enteritidis infections in the United States, 1985-1991. **Journal of Infectious Disease**, v. 169, n. 3, p. 547-52, Mar 1994. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8158026> >.
- MOTA, C. C. S. et al. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella enteritidis*. Relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981. **Higiene Alimentar**, v. 2, p. 123-131, 1983.
- MØLBAK, K. et al. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. **New England Journal of**

Medicine, v. 341, n. 19, p. 1420-5, Nov 1999. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547404> >.

NATARO, J. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 9th. 2007.

NESBITT, A. et al. Integrated surveillance and potential sources of *Salmonella* enteritidis in human cases in Canada from 2003 to 2009. **Epidemiology and Infection**, v. 140, n. 10, p. 1757-72, Oct 2012. ISSN 1469-4409. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22166269> >.

NODA, T. et al. Multi-locus sequence typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis strains in Japan between 1973 and 2004. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 53, p. 38, 2011. ISSN 1751-0147. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672260> >.

NUNES, I. A. et al. Phage typing of *Salmonella* enteritidis from different sources in Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 2, p. 324-7, Feb 2003. ISSN 0362-028X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597496> >.

NĂȘCUȚIU, A. M. The tip of the iceberg: quinolone-resistance conferred by mutations in *gyrA* gene in non-typhoidal *Salmonella* strains. **Roumanian Archives of Microbiology and Immunology**, v. 71, n. 1, p. 17-23, 2012 Jan-Mar 2012. ISSN 1222-3891. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22838215> >.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-9, Jun 1999. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10325304> >.

OLIVEIRA, S. D. et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 720-728, 2007.

OLSEN, S. J. et al. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. **Journal of Infectious Disease**, v. 183, n. 5, p. 753-61, Mar 2001. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181152> >.

PANG, J. C. et al. Pulsed-field gel electrophoresis, plasmid profiles and phage types for the human isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis obtained over 13 years in Taiwan. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 6, p. 1472-83, 2005. ISSN 1364-5072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16313420> >.

PANG, J. C. et al. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 305-12, May 2007. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379345> >.

PARKER, C. T. et al. Comparison of genotypes of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 30 and 9c strains isolated during three outbreaks associated

with raw almonds. **Appl Environ Microbiol**, v. 76, n. 11, p. 3723-31, Jun 2010. ISSN 1098-5336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20363782> >.

PARRY, C. M.; THRELFALL, E. J. Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal *salmonellae*. **Current Opinion of Infectious Disease**, v. 21, n. 5, p. 531-8, Oct 2008. ISSN 1473-6527. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725804> >.

PATRICK, M. E. et al. Salmonella enteritidis infections, United States, 1985-1999. **Emerging Infectious Disease**, v. 10, n. 1, p. 1-7, Jan 2004. ISSN 1080-6040. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15078589> >.

PERESI, J. T. et al. Food borne disease outbreaks caused by *Salmonella* enteritidis. **Revista de Saude Publica**, v. 32, n. 5, p. 477-83, Oct 1998. ISSN 0034-8910. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10030065> >.

PESSÔA, G. V.; DA SILVA, E. A. [A new medium for the rapid presumptive identification of enterobacteriae, Aeromonas and vibrios (author's transl)]. **Annals of Microbiology**, v. 125A, n. 3, p. 341-7, Apr 1974. ISSN 0300-5410. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4420397> >.

RAHMANI, M. et al. Molecular clonality and antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Infantis from broilers in three Northern regions of Iran. **BMC Veterinary Research**, v. 9, p. 66, 2013. ISSN 1746-6148. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23561048> >.

REED, G. H.; KENT, J. O.; WITTEWER, C. T. High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics. **Pharmacogenomics**, v. 8, n. 6, p. 597-608, Jun 2007. ISSN 1744-8042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559349> >.

REEVES, M. W. et al. Clonal nature of *Salmonella* typhi and its genetic relatedness to other *salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 313-20, Feb 1989. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2915026> >.

REEVES, P. Evolution of *Salmonella* O antigen variation by interspecific gene transfer on a large scale. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 1, p. 17-22, Jan 1993. ISSN 0168-9525. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8434412> >.

REZENDE, C. S. M. et al. Serovars of *Salmonella* isolated from carcasses of broilers slaughtered in the State of Goiás, Brazil, and their resistance profiles to antibiotics. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 100, p. 199-203, 2005.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Enteritidis isolated. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 296-299, 2007.

RIBEIRO, A. R. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and environmental broiler chickens and breeders broiler. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 5, p. 1259-1262, 2008.

RIBOT, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006. ISSN 1535-3141. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16602980> >.

RIDLEY, A. M.; THRELFALL, E. J.; ROWE, B. Genotypic characterization of *Salmonella* enteritidis phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsed-field gel electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 8, p. 2314-21, Aug 1998. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9666012> >.

RIVOAL, K. et al. Use of pulsed-field gel electrophoresis to characterize the heterogeneity and clonality of *Salmonella* serotype Enteritidis, Typhimurium and Infantis isolates obtained from whole liquid eggs. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 2, p. 180-6, Feb 2009. ISSN 1879-3460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19128850> >.

ROBERTS, J. A.; SOCKETT, P. N. The socio-economic impact of human *Salmonella* enteritidis infection. **International Journal of Food Microbiology**, v. 21, n. 1-2, p. 117-29, Jan 1994. ISSN 0168-1605. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8155469> >.

ROMANI, C. et al. Reinterpreting a community outbreak of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis in the light of molecular typing. **BMC Public Health**, v. 7, p. 237, 2007. ISSN 1471-2458. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17825103> >.

ROSS, I. L.; HEUZENROEDER, M. W. A comparison of two PCR-based typing methods with pulsed-field gel electrophoresis in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 299, n. 6, p. 410-20, Aug 2009. ISSN 1618-0607. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217348> >.

ROSSOLINE, G. et al. **Molecular cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Salmonella typhi* gene cluster coding for type 1 fimbriae.** . New York, NY: Plenum Publishing Co, 1998.

RUSKOVA, L.; RACLAVSKY, V. The potential of high resolution melting analysis (hrma) to streamline, facilitate and enrich routine diagnostics in medical microbiology. **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 155, n. 3, p. 239-52, Sep 2011. ISSN 1213-8118. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286809> >.

RYCHLIK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. **Veterinary Microbiology**, v. 112, n. 1, p. 1-10, Jan

2006. ISSN 0378-1135. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16303262> >.

SALYERS, A.; WHITT, D. **Salmonella** infection. in: **Bacterial Pathogenesis. A Molecular Approach**. . Washington, DC: ASM Press, 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Spectrophotometry of DNA or RNA. In: SAMBROOK, J. e RUSSEL, D. W. (Ed.). **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. 3. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v.3, 2001. p.A8.20-A8.21.

SANTOS, R. L. et al. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 36, n. 1, p. 3-12, Jan 2003. ISSN 0100-879X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12532221> >.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 67-75, May 1984. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6373014> >.

SHAH, D. H. et al. In vitro and in vivo pathogenicity of *Salmonella* enteritidis clinical strains isolated from North America. **Archives in Microbiology**, v. 193, n. 11, p. 811-21, Nov 2011a. ISSN 1432-072X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21655947> >.

SHAH, D. H. et al. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, v. 157, n. Pt 5, p. 1428-45, May 2011b. ISSN 1465-2080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21292746> >.

SHARIAT, N. et al. The combination of CRISPR-MVLST and PFGE provides increased discriminatory power for differentiating human clinical isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis. **Food Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 164-73, May 2013. ISSN 1095-9998. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23498194> >.

SHARPLES, G. J.; LLOYD, R. G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 22, p. 6503-8, Nov 1990. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2251112> >.

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

SINGH, A. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 3, p. 512-30, Jul 2006. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16847083> >.

SJÖLUND-KARLSSON, M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates, USA. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, n. 11, p. 1789-91, Nov 2010. ISSN 1080-6059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029547> >.

SLINGER, R. et al. High-resolution melting assay for the detection of *gyrA* mutations causing quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovars Typhi and Paratyphi. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 57, n. 4, p. 455-8, Apr 2007. ISSN 0732-8893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156963> >.

SON, I. et al. Analysis of pulsed field gel electrophoresis profiles using multiple enzymes for predicting potential source reservoirs for strains of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from humans. **Infection Genetics and Evolution**, v. 16, p. 226-33, Jun 2013. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23429060> >.

SOUZA, R. A. et al. Evaluation of four molecular typing methodologies as tools for determining taxonomy relations and for identifying species among *Yersinia* isolates. **J Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 2, p. 141-50, Aug 2010. ISSN 1872-8359. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493215> >.

STEVENSON, J. E. et al. Increase in nalidixic acid resistance among non-Typhi *Salmonella enterica* isolates in the United States from 1996 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 195-7, Jan 2007. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088493> >.

STRAHILEVITZ, J. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 4, p. 664-89, Oct 2009. ISSN 1098-6618. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19822894> >.

STUBBS, A. D. et al. Differentiation of *Salmonella* enteritidis phage type 8 strains: evaluation of three additional phage typing systems, plasmid profiles, antibiotic susceptibility patterns, and biotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 199-201, Jan 1994. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8126179> >.

SU, L. H.; CHIU, C. H. *Salmonella*: clinical importance and evolution of nomenclature. **Chang Gung Medical Journal**, v. 30, n. 3, p. 210-9, 2007 May-Jun 2007. ISSN 2072-0939. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17760271> >.

SUH, D. K.; SONG, J. C. Analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolated from human and chickens by repetitive sequence-PCR fingerprinting, antibiotic resistance and plasmid profiles. **Journal of Veterinary Science**, v. 7, n. 1, p. 37-41, Mar 2006. ISSN 1229-845X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16434847> >.

TAMANG, M. D. et al. Prevalence and mechanisms of quinolone resistance among selected nontyphoid *Salmonella* isolated from food animals and humans in Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 11, p. 1199-206, Nov 2011. ISSN 1556-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21877929> >.

TANKOUO-SANDJONG, B. et al. MLST-v, multilocus sequence typing based on virulence genes, for molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

serovars. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, n. 1, p. 23-36, Apr 2007. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17208323> >.

TAUNAY, A. E. et al. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 119-27, 1996 Mar-Apr 1996. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9071031> >.

TAVECHIO, A. T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315-22, 1996 Sep-Oct 1996. ISSN 0036-4665. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9293072> >.

TAVECHIO, A. T. et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 6, p. 1041-4, Jun 2002. ISSN 0362-028X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12092719> >.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 426-39, Jun 1997. ISSN 0899-823X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9181401> >.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-9, Sep 1995. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7494007> >.

THONG, K. L.; LAI, W. L.; DHANOA, A. Antimicrobial susceptibility and pulsed: field Gel Electrophoretic analysis of *Salmonella* in a tertiary hospital in northern Malaysia. **Journal of Infection Public Health**, v. 4, n. 2, p. 65-72, Jun 2011. ISSN 1876-035X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21663875> >.

THRELFALL, E. J.; FROST, J. A. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, n. 1, p. 5-16, Jan 1990. ISSN 0021-8847. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2179197> >.

TONG, S. Y.; GIFFARD, P. M. Microbiological applications of high-resolution melting analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 11, p. 3418-21, Nov 2012. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22875887> >.

TORPDAHL, M. et al. Genotypic characterization of *Salmonella* by multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis and amplified fragment length polymorphism. **Journal of Microbiology Methods**, v. 63, n. 2, p. 173-84, Nov 2005. ISSN 0167-7012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16226640> >.

- URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-87, Oct 2003. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557031> >.
- UZZAU, S. et al. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiol Infect**, v. 125, n. 2, p. 229-55, Oct 2000. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11117946> >.
- VAN BELKUM, A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 22-7, Feb 2007. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266711> >.
- VAN BELKUM, A. et al. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 5017-27, Dec 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393791> >.
- VAZ, C. S. et al. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**, v. 89, n. 7, p. 1530-6, Jul 2010. ISSN 0032-5791. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20548083> >.
- VELGE, P. et al. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. **Microbiology open**, v. 1, n. 3, p. 243-58, Sep 2012. ISSN 2045-8827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170225> >.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-31, Dec 1991. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1762913> >.
- WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 997-1005, Jun 2000. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844685> >.
- WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 6, p. 1156-68, Jun 2006. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533821> >.
- WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 4, p. 378-424, Oct 1989. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680058> >.
- WOZNAK, C. E.; CHEVANCE, F. F.; HUGHES, K. T. Multiple promoters contribute to swarming and the coordination of transcription with flagellar assembly in *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 18, p. 4752-62, Sep 2010. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639318> >.

YANG, B. et al. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 63-72, Jun 2010. ISSN 1879-3460. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20493570> >.

ZHENG, J. et al. Simultaneous analysis of multiple enzymes increases accuracy of pulsed-field gel electrophoresis in assigning genetic relationships among homogeneous *Salmonella* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 85-94, Jan 2011. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20980570> >.

ZOU, M.; KEELARA, S.; THAKUR, S. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 3, p. 232-8, Mar 2012. ISSN 1556-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22283616> >.

Anexo I – Meio de cultura IAL

1- Fase superior (base verde)

1.1 Base

Triptona	10 g
Extrato de carne	2 g
Cloreto de sódio	5 g
Fosfato dissódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	2 g
L- Triptofano	1 g
Sol. Alcoólica de Azul de Bromotimol a 1,5%	2 mL
Ágar	11 g
H ₂ O destilada q.s.p.	1000 mL

Adicionar todos os elementos à água e aquecer até dissolver. Ajustar o pH para 7,4 com solução de NaOH. Filtrar com papel de filtro. Completar o volume para um litro de água destilada e distribuir em balões. Em seguida esterilizar a 121°C por 20 minutos.

1.2 Solução de indicador de substrato

Citrato de ferro amoniacal	2 g
Tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). $5\text{H}_2\text{O}$	2 g
Sacarose.....	80 g
Glicose	10 g
Uréia	40 g
Água	85 mL

Colocar todos os elementos em um vidro esterilizado de 150 mL e aquecer a 65°C durante uma hora.

1.3 Base final

Base (a)	800 mL
Solução (b)	14 mL

Fundir a base, esfriar a 65°C aproximadamente e adicionar a solução b.

2- Fase intermediária (vascar)

2.1. Cera de Carnauba, tipo carnauba flor (Orniex)

Ponto de Fusão= 33- 35°C.

Unidade máxima= 1,0 %

Índice de iodo= 8-12

Índice de acidez= 2,5-5,0

Índice de éster= 74-82

Índice de saponificação= 77-99

2.2 Vaselina líquida (óleo mineral branco)

A porcentagem ótima de mistura vaselina-carnaúba (vascar) é de 90 mL de vaselina para 10 g de cera de carnaúba.

3- Fase Inferior (base roxa)

Extrato de levedura.....3 g
 Glicose.....0,5 g
 KNO₃ .....0,5 g
 L-lisina .....5 g
 Púrpura de bromocresol .....0,02 g
 Ágar bacteriológico .....4 g
 H₂O destilada .....1000 mL
 pH= 6,8

4- Reativo de Erlich para indol

p. Dimetil aminobenzaldeido .....1 g
 Ácido ortofosfórico (D=1,70) .....20 g
 Álcool etílico .....50 mL
 Água destilada q.s.p .....100 mL

Dissolver o p-dimetilaminobenzaldeido no álcool, adicionar ácido ortofosfórico e água.

5- Preparo final do meio

Preparadas todas as fases separadamente, colocar em um tubo de 12X120 mm, uma quantidade de Vascar suficiente para formar um anel de aproximadamente 1 mm de espessura. Distribuir no tubo o meio de lisina (base roxa) em quantidade de aproximadamente 1,5 mL. Autoclavar a 121°C por 20 min e deixar os tubos esfriarem na posição vertical, para que haja um perfeito menisco vetatório de Vascar.

Em seguida, adicionar aproximadamente 3 mL da base verde em cada tubo, deixando-os solidificar inclinados.

6- Aplicação do reativo para indol no algodão

Colocar aproximadamente 10 mL do reativo de Erlich em um pedaço de papel de filtro esterilizado. Retirar o tampão de algodão dos tubos de ensaio 12x120 mm já adicionados do Vascar e da base roxa e tocar a ponta do algodão no papel de filtro com o reativo. Recoloque o tampão no tubo que posteriormente receberá a base verde.

7- Semeadura do inóculo no meio de IAL

Com uma agulha previamente flambada, inócle a cepa a ser pesquisada até o fundo do tubo, retire a agulha cuidadosamente e faça estrias no ápice do meio.

COMPONENTES DO MEIO E SUAS FUNÇÕES

A- Tampão de algodão

Reativo de Ehrlich: Detector de indol

B- Base Verde

Triptona: Fonte de carbono e nitrogênio.

Extrato de carne: Agente enriquecedor do meio, facilitando o crescimento bacteriano e servindo também como fonte de carbono e nitrogênio.

Cloreto de sódio: Estabilizador osmótico.

Fosfato dissódico: Estabilizador de pH.

L-triptofano: substrato para produção de indol e ácido indol pirúvico.

Azul de bromotimol: Indicador de mudança de pH.

pH ácido = meio amarelo

pH alcalino = meio azul

Ágar: Agente solidificante

Água: Agente diluidor

B.1- Solução de indicador e substrato

Citrato férrico amoniacal: Indicador de H₂S e de ácido indol pirúvico.

Sacarose e glicose: Substratos para testes bioquímicos (fermentação) e fontes de carbono para produção de energia.

Uréia: Substrato para verificar se o microrganismo hidrolisa a uréia, através da presença da enzima urease.

Tiosulfato de sódio: fonte de enxofre para produção de H₂S.

Água: Agente diluidor.

C- Fase intermediária (Vascar):

Vascar: Anel vedatório.

D- Base Roxa

Extrato de levedura: Estimula o crescimento bacteriano através de vitaminas do complexo B.

Glicose: Fonte de carbono para produção de energia.

Nitrato de potássio: Mantém a anaerobiose.

L- Lisina: substrato para produção de cadaverina, através da L-lisina descarboxilase.

Ágar: Agente solidificante. A baixa concentração de ágar nessa fase (0,4%) possibilita a verificação da motilidade bacteriana.

Púrpura de bromocresol: Indicador de mudança de pH.

pH ácido= meio amarelo

pH alcalino= meio roxo

Água: Agente diluidor

Figura ilustrativa do meio IAL (Pessôa e Da Silva, 1974).

Anexo II – Sequência, tamanho do *amplicon* e referência dos *primers* utilizados nesse estudo

Genes	Primers	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Temperatura de hibridação/°C	<i>Amplicon</i> (pb)	Referências	Item
<i>sdfI</i>	Forward	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG	53	333	AGRON et al., (2001)	3.6
	Reverse	CGTTCTTCTGGTACTTACGATGAC				
<i>InvA</i>	Forward	ACA GTG CTC GTT TAC GAC CTG AAT	53	244	HUR et al., (2011)	3.7
	Reverse	AGA CGA CTG GTA CTG ATC GAT AAT				
<i>flgK</i>	Forward	ATGTCCAGCTTGATTAATCAC	47	1659	SHAH et al., (2011)	3.7
	Reverse	GCGAATATTCAATAACGCATC				
<i>fljB</i>	Forward	ATGGCACAAGTCATTAATACAAAC	48	1515	SHAH et al., (2011)	3.7
	Reverse	ACGCAGTAAAGAGAGGAC				
<i>flgL</i>	Forward	ATGCGTATCAGTACCCAGATG	50	951	SHAH et al., (2011)	3.7
	Reverse	CCGGTTCAACTGGAAAAGC				
<i>Prot6E</i>	Forward	GGCACCGCAGCAATGGTTGG	57	135	HADJINICOLAOU et al., (2009)	3.7
	Reverse	GGTCGAGCTACAGAGAGTCACAC				
<i>sifA</i>	Forward	ATG CCG ATT ACT ATA GGC AAT GG	49	1011	HUR et al., (2011)	3.7
	Reverse	TTA TAA AAA ACA ACA TAA ACA GCCG				
<i>sipA</i>	Forward	ATGGTTACAAGTGTAAGGACTCAG	54	2055	SHAH et al., (2011)	3.7
	Reverse	ACGCTGCATGTGCAAGCCATC				
<i>sipD</i>	Forward	ATGC TCCTTGCAGGAAGCTTTTG	47	1029	SHAH et al., (2011)	3.7
	Reverse	TTAATATTCAAAATTATTCCG				

Continua

Continuação

Genes	Primers	Sequência dos primers (5' – 3')	Temperatura de hibridação/°C	Amplicon (pb)	Referências	Item
<i>sopB</i>	Forward	CCT CAA GAC TCA AGA TG	47	1987	HUR et al., (2011)	3.7
	Reverse	TAC GCA GGA GTA AAT CGG TG				
<i>sopD</i>	Forward	ACG ACC ATT TGC GGC G	50	1291	HUR et al., (2011)	3.7
	Reverse	GAG ACA CGC TTC TTC G				
<i>sopE2</i>	Forward	TAC TAC CAT CAG GAG G	44	995	HUR et al., (2011)	3.7
	Reverse	GAA TGT TTT ATG TGA CGC AG				
<i>spvB</i>	Forward	CGGTTATAGAAGAGCTCCTGT	50	349	RYCHLÍK et al., (2008)	3.7
	Reverse	CCGGTATACGACTCTGTGATC				
<i>ssaR</i>	Forward	GTT CGG ATT CAT TGC TTC GG	52	1628	HUR et al., (2011)	3.7
	Reverse	TCT CCA GTG ACT AAC CCT AAC CAA				
<i>SA89</i>	Forward	GAC GTA ATC GGT AAA TAC CAT CC	55	89	SLINGER et al., (2007)	3.8.1
	Reverse	ATG TAA CGC AGC GAG AAT G				
<i>gyrA1</i>	Forward	CAT GAA CGT ATT GGG CAA TG	50	305	JEONG et al., (2011)	3.8.2
<i>stgyrA2</i>	Reverse	CCG TAC CGT CAT AGT TAT CC				
<i>qnrA</i>	Forward	ATT TCT CAC GCC AGG ATT TG	51	574	JACOBY et al., (2009)	3.8.3
	Reverse	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC				
<i>qnrB</i>	Forward	CGA CCT KAG CGG CAC TGA AT	58	513	JACOBY et al., (2009)	3.8.3
	Reverse	GAG CAA CGA YGC CTG GTA GYT G				
<i>qnrC</i>	Forward	GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC G	45	307	KIM et al., (2009)	3.8.3
	Reverse	CAC CTA CCC ATT TAT TTT CA				

Continua

Continuação

Genes	Primers	Sequência dos primers (5' – 3')	Temperatura de hibridação/°C	Amplicon (pb)	Referências	Item
<i>qnrD</i>	Forward	TGT GAT TTT TTC AGG GGT TGA	50	520	TAMANG et al., (2011)	3.8.3
	Reverse	CCT GCT CTC CAT CCA ACT TC				
<i>qnrS</i>	Forward	ACT GCA AGT TCA TTG AAC AG	48	431	JACOBY et al., (2009)	3.8.3
	Reverse	GAT CTA AAC CGT CGA GTT CG				
<i>qepA</i>	Forward	AAC TGC TTG AGC CCG TAG AT	53	596	KIM et al., (2009)	3.8.3
	Reverse	GTC TAC GCC ATG GAC CTC AC				
<i>ERIC1</i>	Forward	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	52	-	VERSALOVIC et al., (1991)	3.9
<i>ERIC2</i>	Reverse	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G				
<i>SENTR1</i>	Forward	HEX -GCAACAGCAGCAGCAACAG	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	CCGAGCTGAGATCGCCAAG				
<i>SENTR2</i>	Forward	FAM -CAC TGG ACG ATC TGG ATT TCT C	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	GTC GCC GTT ACG CAT CAA C				
<i>SENTR3</i>	Forward	TET -CTA AAC AAG CCG CTC ATC CG	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	ACA ACC TGC TGC TGT GCT G				
<i>SENTR4</i>	Forward	HEX -GAC CAA CAC TCT ATG AAC CAA TG	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	ACC AGG CAA CTA TTC GCT ATC				
<i>SENTR5</i>	Forward	FAM -CAC CGC ACA ATC AGT GGA AC	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	GCG TTG AAT ATC GGC AGC ATG				
<i>SENTR6</i>	Forward	TET -ATG GAC GGA GGC GAT AGA C	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	AGC TTC ACA ATT TGC GTA TTC G				

Continua

Continuação

Genes	Primers	Sequência dos <i>primers</i> (5' – 3')	Temperatura de hibridação/°C	<i>Amplicon</i> (pb)	Referências	Item
SENTR7	Forward	FAM -ACG ATC ACC ACG GTC ACT TC	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	CGG ATA ACA ACA GGA CGC TTC				
SE-3	Forward	HEX -CAA CAA AAC AAC AGC AGC AT	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	GGG AAA CGG TAA TCA GAA AGT				
SE-7	Forward	HEX -GAT AAT GCT GCC GTT GGT AA	58	-	MALORNY et al., (2008)	3.13.1
	Reverse	ACT GCG TTT GGT TTC TTT TCT				
aroC	Forward	CCTGGCACCTCGCGCTATAC	58	826	MLST-UCC	3.14.2
	Reverse	CCACACACGGATCGTGGCG				3.14.3
	Seq F	GGCACCAGTATTGGCCTGCT				
	Seq R	CATATGCGCCACAATGTGTTG				
dnaN	Forward	AATTTCTCATTCGAGAGGATTGC	58	833	MLST-UCC	3.14.2
	Reverse	CCGCGGAATTTCTCATTCGAG				3.14.3
	Seq F	CCGATTCTCGGTAACCTGCT				
	Seq R	CCATCCACCAGCTTCGAGGT				
hemD	Forward	GAAGCGTTAGTGAGCCGTCTGCG	55	666	MLST-UCC	3.14.2
	Reverse	ATCAGCGACCTTAATATCTTGCCA				3.14.3
	Seq F	GTGGCCTGGAGTTTTCCACT				
	Seq R	GACCAATAGCCGACAGCGTAG				

Continua

Conclusão

Genes	Primers	Sequência dos primers (5' – 3')	Temperatura de hibridação/°C	Amplicon (pb)	Referências	Item
<i>hisD</i>	Forward	GAAACGTTCCATTCCGCGC	58	894	MLST-UCC	3.14.2
	Reverse	GCGGATTCCGGCGACCAG				
	Seq F	GTCGGTCTGTATATTCCTGG				3.14.3
	Seq R	GGTAATCGCATCCACCAAATC				
<i>purE</i>	Forward	GACACCTCAAAAGCAGCGT	55	510	MLST-UCC	3.14.2
	Reverse	AGACGGCGATACCCAGCGG				
	Seq F	CGCATTATTCCGGCGCGTGT				3.14.3
	Seq R	CGCGGATCGGGATTTTCCAG				
<i>sucA</i>	Forward	CGCGCTCAAACAGACCTAC	58	643	MLST-UCC	3.14.2
	Reverse	GACGTGGAAAATCGGCGCC				
	Seq F	AGCACCGAAGAGAAACGCTG				3.14.3
	Seq R	GGTTGTTGATAACGATACGTAC				
<i>thrA</i>	Forward	GTCACGGTGATCGATCCGGT	58	852	MLST-UCC	3.14.2
	Reverse	CACGATATTGATATTAGCCCG				
	Seq F	ATCCCGGCCGATCACATGAT				3.14.3
	Seq R	CTCCAGCAGCCCCTCTTTCAG				