UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica

Cristiano Andrigheto

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Maria Teresa Destro

São Paulo
2006

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.

DEDALUS - Acervo - CQ

30100012272

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Andrigheto, Cristiano

A573di Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica / Cristiano Andrigheto. -- São Paulo, 2006.
97p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental

Orientador: Destro, Maria Teresa

I. Microbiologia de alimentos 2. Ciência dos alimentos
I. T. II. Destro, Maria Teresa, orientador.

664.07 CDD

Cristiano Andricheto

Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, 23 de maio de 2006.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Relatório de Defesa

Relatório de defesa pública de Tese do(a) Senhor(a) Cristiano Andrigheto no Programa: Ciência dos Alimentos, do(a) Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Aos 26 dias do mês de maio de 2006, no(a) Anfiteatro Verde - FCF / USP realizou-se a Defesa da Tese do(a) Senhor(a) Cristiano Andrigheto, apresentada para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos - Área: Bromatologia, intitulada:

"Disseminação de 'Salmonella' Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica"

Após declarada aberta a sessão, o(a) Sr(a) Presidente passa a palavra aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:

Nome dos Participantes da Banca	Vínculo do Docente	Sigla da Unidade	Resultado
Maria Teresa Destro	Presidente	FCF - USP	Aprovado
José Paes de Almeida Nogueira Pinto	Suplente	UNESP - Externo	Aprovado
Edir Nepomuceno da Silva	Titular	SemVínculo - Externo	Aprovado
Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco	Titular	FCF - USP	Aprovado
Marina Baquerizo Martinez	Titular	FCF - USP	Aprovado
Resultado Final: <i>Aprovado</i>			
Parecer da Comissão Julgadora *			

Comentários da Defesa (opcional)

Eu, Edilson Feitosa dos Santos, Técnico Acadêmico, lavrei a presente ata, que assino juntamente com os(as) Senhores(as) São Paulo, aos 26 dias do mês de maio de 2006.

José Paes de Almeida Nogueira Pinto

Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco

Edir Nepomuceno da Silva

Marina Baquerizo Martinez

Maria Teresa Destro
Orientador(a)

* Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Nos termos do artigo 110, do RG-USP, encaminhe-se o presente relatório à CPG, para homologação

Impresso em: 23/05/2006

À Cláucia, minha mãe, e à Viviana, minha irmã, com muita gratidão, pelo apoio, compreensão e carinho durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

À porção da minha família menos próxima -
fisicamente - de mim, Diógenes, Eli, Eduardo
e Gabriel, por todo o suporte e carinho que
sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

- À professora Dr^a. Maria Teresa Destro, por me orientar na realização deste trabalho, pela amizade e paciência em momentos especiais.
- Às professoras Dr^a. Mariza Landgraf e Dr^a. Bernadette D. G. M. Franco, pelo carinho e pelo apoio nos vários anos que passei no Laboratório de Microbiologia de Alimentos.
- Ao frigorífico e aos responsáveis pelo Laboratório de Microbiologia e Garantia da Qualidade, por fornecerem os isolados e dados pertinentes para utilização neste trabalho.
- À Fundação Oswaldo Cruz (RJ) e à Dr^a. Eliane Moura Falavina dos Reis, do Laboratório de Enterobactérias, pela realização da fagotipagem e confirmação sorológica dos isolados.
- À Prof^a. Dr^a. Elsa Masae Mamizuka, do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, à Dr^a. Silvia Figueiredo Costa, do Laboratório de Investigação Médica 54 da FM-USP e ao Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF-USP, por cederem equipamentos e laboratórios durante partes da execução deste projeto.
- Aos professores Dr. Edir Nepomuceno da Silva, Dr. Ângelo Berchieri Júnior, Dr^a. Marina Baquerizo Martinez e Dr. Raphael Lúcio Andreatti Filho, pelas sugestões feitas no exame de qualificação e em outras etapas do desenvolvimento deste trabalho.
- Aos colegas Vinícius Buccelli Ribeiro, Cristina Durante Cruz, Nilton E. H. Lincopan, Luciano dos Santos Bersot, Priscila de Arruda Trindade e Thomas Prates Ong, pela parceria, colaboração, troca de experiências e, sobretudo, pela amizade.
- Às funcionárias Kátia e Lúcia, do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela amizade, convívio e pela ajuda em situações especiais.

- Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos: Ricardo, Eb, Ana Eucares, Hans, Lina, Gabriela, Cíntia, Patrícia Kary, Daniela, Ana Manuel, Vanessa Vieira, Cecília, Tatiana, Paulo, Denise, Marildes, Vanessa Tshako, Antônio, Kátia, Monika, Janine, Susana, Gunnar, Patrícia Bettini e Alcina.
- Às bibliotecárias Leila Aparecida Bonadio e Marina M. Yamashita, da Biblioteca do Conjunto das Químicas da USP, pela revisão das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.
- Ao pessoal das Secretarias de FBA e de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas: Mônica, Tânia, Edilson, Elaine e Jorge.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, pela bolsa de doutorado durante parte do período de desenvolvimento deste trabalho.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo - FAPESP, pelo financiamento do projeto de pesquisa.
- E a todos que colaboraram, direta ou indiretamente, com este trabalho.

RESUMO

ANDRIGHETO, C. Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica. 2006. 97 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Salmonella é um dos principais agentes de enfermidades transmitidas por alimentos em diversos países, sendo a carne de frango um dos principais veículos envolvidos em surtos. O Brasil vem se destacando como um dos maiores exportadores mundiais deste alimento. O ambiente de criação das aves é apontado como um importante foco de infecção das aves e o ambiente industrial de abate e processamento é importante na disseminação deste microrganismo. Na busca pela produção de alimentos seguros do ponto de vista microbiológico, uma das ferramentas utilizadas é a subtipagem de microrganismos isolados ao longo da cadeia de produção, que permite determinar rotas de contaminação do produto final. Os objetivos deste trabalho são: o estudo da disseminação dos subtipos de *Salmonella* Enteritidis nas várias etapas de uma cadeia de produção industrial de carne de frango, empregando-se diversos métodos de subtipagem e a determinação da resistência a antimicrobianos destas cepas. 108 isolados de *Salmonella* Enteritidis dos fagotipos PT1, PT4 e PT7a foram obtidos nos anos de 2002 e 2003, a partir de amostras ambientais e de frango relativas a sete sub-regiões de uma cadeia produtiva industrial avícola. Os perfis de resistência destes isolados foram determinados frente a antimicrobianos de uso humano e veterinário e eles foram submetidos a subtipagem por PFGE, RAPD, ribotipagem e PCR-ribotipagem. Foram detectados 21 perfis de resistência diferentes, com 6,5% das cepas sensíveis a todas as drogas, 33,3% resistentes a um ou dois antimicrobianos e 83,3% apresentando resistência intermediária a até quatro deles. Os níveis relativamente

elevados de resistência são preocupantes e a diminuição da pressão seletiva deve ser um objetivo para os produtores de aves. De modo geral, a subtipagem permitiu separar as cepas em 13 genótipos, com elevada similaridade entre si. Porém, a maior parte das cepas (69,4%) pertenceu a apenas três deles, que foram encontrados ao longo de toda a cadeia produtiva. A ribotipagem foi o método que apresentou o melhor poder discriminatório ($D = 0,701$), porém nem todas as cepas foram tipáveis por este método. Não foram encontradas correlações entre os perfis de resistência a antimicrobianos e fagotipos, nem entre genótipos e fagotipos. Porém, dois genótipos proximamente correlacionados e predominantemente encontrados em uma sub-região reuniram apenas cepas com resistência intermediária ou resistentes exclusivamente à furazolidona. A similaridade elevada entre os genótipos evidencia a origem clonal das cepas.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, frango, fagotipagem, resistência a antimicrobianos, subtipagem genética

ABSTRACT

ANDRIGHETO, C. *Salmonella* Enteritidis in a commercial chicken production chain: phenotypic and genotypic characterization. 2006. 97 f. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Salmonella is one of the most important foodborne disease agents all over the world, and chicken is recognized as an important vehicle of the infection. Chicken production in Brazil has increased in the last couple of years and the country is now ranked 2nd as producer/exporter of this commodity. For this reason there is an increased concern over the safety of these goods. This study deals with the dissemination, antimicrobial resistance, and genetic characterization of *S. Enteritidis* strains isolated from an industrial chicken production chain. 108 isolates, phagetypes PT1, PT4 and PT7a, were obtained at different steps of the commercial production from farm to frozen cuts, and the broilers were from different producers supplying the same processing plant. Tests for susceptibility to 12 human and veterinary antimicrobial agents were performed. The strains were also typed by PFGE, RAPD, ribotyping, and PCR-ribotyping. 6.5% of the strains were susceptible to the 12 drugs tested and 33.3% were resistant to 1 or 2 of them. Intermediate resistance to up to 4 agents was observed in 83.3% of the isolates. Combining all the typing methods allowed the division of the strains in 13 genotypes with elevated degree of similarity. However, 69.4% of the strains belonged to 3 main phagetypes spread along the production chain. There was no correlation between phagetypes and genotypes, or phagetypes and resistance profiles. However, most strains from one sub-region were from 2 genotypes and showed intermediate resistance to, or were resistant to furazolidone. The high degree of similarity amongst the genotypes indicates the clonal origin of the strains. The relatively high resistance to antimicrobial agents is a

cause of concern and trying to diminish the selective pressure has to be a goal for broiler producers.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, poultry, phagetyping, antimicrobial resistance, genetic typing

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1. Cepas bacterianas	29
3.2. Perfil de resistência a antimicrobianos	31
3.3. Análise do perfil de macro-restrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE)	32
3.4. Análise do polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)	33
3.5. Ribotipagem	34
3.6. PCR-Ribotipagem	36
3.7. Análise dos Resultados	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5. CONCLUSÕES	80
6. REFERÊNCIAS	82

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Origem das 108 <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme o tipo de amostra	39
Tabela 2. Origem das 108 <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme ponto de coleta e região do integrado.....	40
Tabela 3. Distribuição das 107 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os fagotipos encontrados.....	42
Tabela 4. Distribuição das 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os 21 perfis de resistência a antimicrobianos	44
Tabela 5. Distribuição das 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os as três categorias de resistência frente a 12 antimicrobianos	45
Tabela 6. Distribuição das 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os três perfis PFGE obtidos com as enzimas de restrição Xba I e Spe I.....	52
Tabela 7. Distribuição das 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os três perfis RAPD obtidos com os "primers" OPB17 e 23L	57
Tabela 8. Distribuição das 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os ribotipos e grupo não tipável obtidos com a enzima de restrição Pst I e hibridização com sonda de 1,3kb	64

Tabela 9. Distribuição das 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os 13 genótipos obtidos usando PFGE, RAPD, ribotipagem e PCR-ribotipagem	71
Tabela 10. Distribuição dos 13 genótipos de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme ponto de coleta (P1 a P11) e região do integrado (R1 a R7).....	73
Tabela 11. Distribuição da resistência a antimicrobianos e fagotipo de 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme o genótipo	77

LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Representação esquemática da cadeia de produção industrial de frango congelado, indicando os pontos de coleta de amostras	30
Figura 2. Perfis PFGE obtidos com as enzimas de restrição Xba I e Spe I para 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> (X1, X2, S1, S2) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, <i>S. Senftenberg</i> (SS), <i>S. Enteritidis</i> ATCC13076 (SE) e <i>E. coli</i> ATCC25922 (EC)	51
Figura 3. Representação da correlação entre os três perfis PFGE obtidos com as enzimas de restrição Xba I e Spe I para 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> (PFGE1, PFGE2 e PFGE3) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, <i>S. Senftenberg</i> (SS), <i>S. Enteritidis</i> ATCC13076 (SE) e <i>E. coli</i> ATCC25922 (EC).....	53
Figura 4. Perfis RAPD obtidos com os "primers" OPB17 e 23L para 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> (O1, O2, L1, L2) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, <i>S. Senftenberg</i> (SS), <i>S. Enteritidis</i> ATCC13076 (SE) e <i>E. coli</i> ATCC25922 (EC).....	56
Figura 5. Representação da correlação entre os três perfis RAPD obtidos com os "primers" OPB17 e 23L para 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> (RAPD1, RAPD2 e RAPD3) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, <i>S. Senftenberg</i> (SS), <i>S. Enteritidis</i> ATCC13076 (SE) e <i>E. coli</i> ATCC25922 (EC)	58
Figura 6. Ribotipos obtidos com a enzima de restrição Pst I e hibridização com sonda de 1,3kb para 85 cepas de <i>S. Enteritidis</i> (P1 a P4) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, <i>S. Senftenberg</i> (SS), <i>S. Enteritidis</i> ATCC13076 (SE) e <i>E. coli</i> ATCC25922 (EC)	63

Figura 7. Representação da correlação entre os 4 ribotipos e grupo não tipável obtidos com a enzima de restrição Pst I e hibridização com sonda de 1,3kb para 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> (P1 a P4, NT) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, <i>S. Senftenberg</i> (SS), <i>S. Enteritidis</i> ATCC13076 (SE) e <i>E. coli</i> ATCC25922 (EC)	65
Figura 8. PCR-ribotipos obtidos para 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> (C1) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, <i>S. Senftenberg</i> (SS), <i>S. Enteritidis</i> ATCC13076 (SE) e <i>E. coli</i> ATCC25922 (EC)	68
Figura 9. Representação da correlação genética entre os 13 genótipos obtidos usando PFGE, RAPD, ribotipagem e PCR-ribotipagem para 108 cepas de <i>S. Enteritidis</i> (G1 a G13) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, <i>S. Senftenberg</i> (SS), <i>S. Enteritidis</i> ATCC13076 (SE) e <i>E. coli</i> ATCC25922 (EC) e respectivas representações dos padrões de bandas	72

1. INTRODUÇÃO

Salmonella é o patógeno causador de enfermidade transmitida por alimentos (ETA) mais freqüente em diversos países. Segundo HOGUE (2002) nos Estados Unidos (EUA), entre 1960 e 1996, houve um aumento marcante no número de casos de salmonelose, o mesmo ocorrendo no Reino Unido, Japão, Alemanha e Austrália.

Nos EUA, em 2001, *Salmonella* foi o mais freqüente agente causal de ETA diagnosticado laboratorialmente (CDC, 2002). Na Inglaterra no biênio 2001-2002, o microrganismo foi responsável por aproximadamente 31.000 casos de ETA, tendo sido superado apenas por *Campylobacter* (PHLS, 2002, 2003).

No Brasil, *Salmonella* também é a causa mais importante de infecção de origem alimentar. Do total de 518 surtos de ETA ocorridos no país entre 1993 e 2002 e relatados ao SIRVETA (Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos) (PANALIMENTOS, 2003), 219 foram causados por este patógeno, com 10.812 pessoas afetadas. Apesar de elevados, estes números estão aquém da realidade, uma vez que a ocorrência de surtos é sub-relatada.

O gênero *Salmonella* é constituído pelas espécies *S. enterica* e *S. bongori*, sendo a primeira dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie (ou espécie, no caso de *S. bongori*) ainda é subdividida em função de seu perfil antigênico. Assim, a espécie *S. bongori* agrupa 22 sorotipos e as subespécies de *S. enterica* agrupam 1.504, 502, 95, 333, 72 e 13 sorotipos, respectivamente (POPOFF et al., 2004). O Centers for Diseases Control (CDC) americano sugere que para abreviar pode-se usar, por exemplo,

Salmonella Enteritidis ou *S. Enteritidis* (SE) para se referir a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Enteritidis (BRENNER et al., 2000).

Por décadas o sorotipo Typhimurium predominou como principal agente de salmonelose humana. Porém, a partir da década de 80 o sorotipo Enteritidis tem sido responsável pela maioria dos casos e surtos de salmonelose mundialmente (RAMPLING, 1993; UYTENDAELE et al., 1998).

No Brasil cepas de *Salmonella* isoladas de amostras humanas e não humanas (alimentos, animais, ração, água, esgoto e ambiente) começaram a ser identificadas mais freqüentemente como SE a partir de 1993. Isto pode ser constatado quando se comparam os dados apresentados por TAUNAY et al. (1996) e por TAVECHIO et al. (1996).

O reservatório das salmonelas na natureza é o trato intestinal de humanos e animais de sangue frio ou quente, e os diversos sorotipos de *Salmonella* são capazes de causar uma ampla gama de doenças em humanos, variando de gastroenterite branda a bacteremia e meningite (SALYERS & WHITT, 1994).

MEAD et al. (1999) estimam que em 95% dos casos - incluindo indivíduos envolvidos em surtos - de salmonelose não-tifóide houve transmissão do patógeno por alimento. Os alimentos mais freqüentemente identificados como veículos em casos ou surtos de salmonelose são os ovos e derivados, carnes vermelhas, de aves e derivados (RAMPLING, 1993; BRYAN & DOYLE, 1995; HENSON, 1997; PANALIMENTOS, 2003). Dentre os animais, as aves representam um importante foco de contaminação por este microrganismo, sendo sua prevalência nestes animais muito elevada (UYTENDAELE et al., 1998; BELI et al., 2001).

SILVA & DUARTE (2002) apresentam uma extensa revisão sobre o problema da presença de SE em aves no Brasil. Segundo estes autores até 1993 SE era raramente isolada em granjas avícolas, apesar da ocorrência de *Salmonella* ser

elevada nestas propriedades. Estudos compilados por eles, e realizados após esta data, mostraram um aumento na percentagem de isolamento deste sorotipo nas amostras provenientes de materiais avícolas.

Dentre os 376 isolados de *Salmonella* avaliados por um laboratório de diagnóstico avícola entre 1997 e 2001, SE foi identificado em 82,4% (SILVA & DUARTE, 2002). Dentre estes isolados, provenientes de diferentes tipos de exploração avícola, é interessante ressaltar que 63,3% eram provenientes de frangos de corte e que destes, 89,5% eram SE.

Análises realizadas em carcaças de frangos congeladas ou resfriadas e coletadas em diferentes cidades do Estado de São Paulo indicam que a presença de SE é elevada neste produto (FUZIHARA, 2001; LÍRIO et al., 1998; SANTOS et al., 2000).

No estudo realizado por TAVECHIO et al. (2002), foram determinados os sorotipos de 4581 cepas de *Salmonella* de origem não humana - incluindo alimentos, frango e outros animais, vísceras, fezes, ambiente, ração animal e água. Das cepas estudadas, 993 eram provenientes de granjas avícolas com controle para salmonelose e destas 526 (53%) foram identificadas como sendo SE. Aproximadamente 92% das cepas identificadas como sendo SE eram provenientes de alimentos para humanos e de animais das granjas.

As rações, que em muitos casos podem ser um importante veículo para disseminação de microrganismos para os animais, parecem não desempenhar papel preponderante na infecção de lotes de aves por SE (SILVA & DUARTE, 2002).

Segundo os mesmos pesquisadores, o ambiente dos galpões de criação é, ao lado da aquisição de aves livres de SE, um importante fator no controle da contaminação das aves. Assim, a limpeza, desinfecção e combate a roedores são

etapas importantes no controle e erradicação de SE em granjas avícolas (SILVA & DUARTE, 2002).

No abatedouro, o ambiente também pode ser uma fonte importante na disseminação de *Salmonella*, pois uma vez instalada a contaminação pelo microrganismo na indústria sua remoção é dificultada devido à sua capacidade em formar biofilmes (JOSEPH et al. 2001) e de se multiplicar a baixas temperaturas (D'AOUST, 1991). Isto pode ser comprovado no trabalho de FUZIHARA et al. (2000) que verificaram a presença de *Salmonella* spp. em amostras de utensílios (23,1%) e de superfícies de refrigeradores e congeladores (71,4%) colhidas em 60 pequenos abatedouros da cidade de Mauá, SP.

O Brasil vem crescendo a cada ano no cenário da produção mundial da carne de frango e no ano de 2004 foi o segundo maior produtor mundial de carne de frango e seus derivados. Em 2004, de acordo com dados no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, a produção total de carne de frango foi de aproximadamente 8,5 milhões de toneladas, valor este 42% superior ao do ano de 2000 (BRASIL, 2005c). Deste total, foram exportados 2,4 milhões de toneladas, o que gerou, segundo a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (Abef), uma receita cambial de aproximadamente 2,6 bilhões de dólares (ABEF, 2005). Com este desempenho, o Brasil é hoje o maior exportador mundial de carne de frango em divisas e em volume. Apesar do aumento das exportações, há ainda que se considerar a importância do mercado interno, onde 71% da produção são negociados, como se pode perceber pelos dados apresentados.

Se por um lado a globalização da comercialização dos alimentos oferece benefícios e oportunidades, por outro apresenta novos riscos, como da transmissão de agentes infecciosos através das fronteiras ("crossborder"). Estes agentes podem

ser disseminados do ponto de produção primária, processamento ou embalagem para outro continente tornando a segurança alimentar um desafio para as nações (FAO, 2003).

Órgãos como FAO e OMS têm se empenhado em desenvolver estratégias que permitam aos países garantir a segurança dos alimentos. Um dos problemas focados por eles é o controle de *Salmonella* em aves de corte. Documentos elaborados por especialistas têm mostrado que ainda são raros os dados sobre contaminação cruzada que possa ocorrer nas diferentes etapas da produção de frango de corte, desde a sua criação até o consumo final ("from farm to fork") (FAO, 2003). Além disso, de acordo com a Codex Alimentarius Commission, ainda são escassos os dados sobre prevalência de *Salmonella* em frangos de corte em diversas regiões como América do Sul, África e Ásia (FAO, 2002).

Empresas que rotineiramente pesquisam a presença de microrganismos patogênicos em suas instalações, e em produtos finais, geralmente não transmitem essas informações à comunidade científica nem tornam seus dados públicos. Isso se deve provavelmente ao temor da publicidade negativa e potencial perda financeira que poderiam resultar da divulgação destas informações. Por isso, apesar da elevada incidência de *Salmonella* em aves no Brasil, ainda são poucos os dados publicados que mostram sua disseminação desde a produção primária até o produto final. São poucos também os dados a respeito do perfil genético de cepas de *Salmonella* isoladas de aves e produtos de aves no Brasil.

Na busca da produção de alimentos seguros à saúde do consumidor, do ponto de vista microbiológico, tem-se tentando identificar as fontes de contaminação por patógenos nas diversas etapas de produção de alimentos. Uma ferramenta importante nesta identificação é a subtipagem dos isolados. A ligação

epidemiológica entre as linhagens isoladas permite que se determine, com precisão, os locais onde uma linhagem aparece ou desaparece, revelando etapas que contribuem para a contaminação final do produto (DODD, 1994).

Um dos primeiros métodos utilizados na tentativa de diferenciar cepas de SE foi a fagotipagem, que testa a suscetibilidade da cepa à infecção por um conjunto de bacteriófagos (WARD et al., 1987). O método é utilizado em poucos laboratórios, pois a manutenção do conjunto de fagos exige cuidados especiais. Além disso, o método apresenta baixo poder discriminatório por haver predomínio de determinados fagotipos em algumas áreas geográficas (LACONCHA et al., 1998). Por exemplo, nos EUA a maioria das cepas isoladas é dos fagotipos (PT) PT8 ou PT13a; na Europa e no Brasil predominam cepas do PT4 (COX, 1995; IRINO et al., 1996; PIGNATO et al., 1996; HOFER et al., 1997; PERESI et al., 1998; PHLS 2002, 2003). Apesar de ser pouco eficiente para a diferenciação de cepas possivelmente relacionadas entre si em alto grau, como no caso de uma cadeia de produção restrita a uma pequena região geográfica, este é um método clássico de tipagem, usado como referência, e com capacidade de prover diferenciação de cepas não diferenciáveis por outros métodos.

Outro método clássico que pode ser utilizado para subtipagem, e que vem se tornando cada vez mais importante, é a análise do perfil de resistência a antimicrobianos. A importância deste método se deve ao surgimento de cepas de *Salmonella* resistentes a múltiplos antibióticos - inclusive às drogas de escolha normalmente empregadas no tratamento das infecções em humanos - e à ocorrência de epidemias causadas por estas cepas (NASTASI et al., 2000; HAKANEN et al., 2001; OPLUSTIL et al., 2001). Um dos fatores que provavelmente contribuiu para a seleção de cepas de *Salmonella* resistentes a antibióticos foi o uso destes agentes como promotores de crescimento na criação de aves (AHRNE & FRANKLIN, 1997).

VITAL BRAZIL et al. (1999) observaram que 59,6% de 1133 cepas examinadas, originárias de diversos estados brasileiros, apresentavam resistência à tetraciclina. A resistência a antimicrobianos estava associada principalmente a cepas provenientes de aves de Santa Catarina e de matéria prima proveniente do Paraná.

Os métodos que pesquisam diferenças a nível molecular ganharam importância a partir dos anos 80. Porém, mesmo alguns desses métodos apresentam baixo poder discriminatório para SE. Por exemplo, a análise do perfil plasmidial tem utilidade limitada para muitos microrganismos que não carregam ou carregam poucos plasmídeos - como no caso de SE do fagotipo 4 (PT4), que muitas vezes tem apenas um plasmídeo (LUKINMAA et al., 1999). Por outro lado, alguns métodos baseados na análise do DNA genômico ganharam importância por possibilitar a diferenciação de subtipos entre cepas consideradas relacionadas pelos métodos anteriormente disponíveis.

O método de restrição do DNA genômico por enzimas de alta frequência de corte (REA, "restriction endonuclease analysis") é um método que já vem sendo empregado há algum tempo (MARTINETTI & ALTWEGG, 1990; FARBER, 1996). Porém, devido à frequência de corte ser elevada, este método gera um número muito grande de fragmentos de DNA. A hibridização dos fragmentos gerados por REA com sondas como RNA ribossomal (rRNA) 16S+23S, que corresponde a seqüências altamente conservadas no genoma bacteriano, permite reduzir o número de fragmentos a serem analisados (OLSEN et al., 1994).

Na ribotipagem, após a restrição enzimática do DNA e separação dos fragmentos por eletroforese, são empregadas sondas complementares aos genes que codificam o rRNA, permitindo a caracterização das cepas com base na localização e número de cópias de seus genes rRNA (GRIMONT & GRIMONT, 1986; MARTINETTI & ALTWEGG, 1990). As principais vantagens deste método são

a estabilidade e a reprodutibilidade (USERA et al., 1994; LANDERAS & MENDOZA, 1998). Porém, a etapa de hibridização é trabalhosa e demorada e algumas vezes o método apresenta pouco poder discriminatório (FARBER, 1996). Quando empregada na subtipagem de SE, a ribotipagem apresentou resultados variáveis. Alguns pesquisadores (MILLEMANN et al., 1995; LIEBISCH & SCHWARZ, 1996; WEIDE-BOTJES et al., 1998; NUNES, 1999) não puderam diferenciar cepas não-relacionadas ou diferenciaram poucos subtipos (RIDLEY et al., 1998), mesmo usando mais de uma enzima de restrição. Essa limitação da técnica é atribuída à origem altamente clonal dos microrganismos deste sorotipo (THONG et al., 1995). Porém, em diversos outros estudos (OLSEN et al., 1994; USERA et al., 1994; LANDERAS et al., 1996; PIGNATO et al., 1996; LANDERAS & MENDOZA, 1998) o método apresentou bons resultados na subtipagem de SE de diversas origens.

A pesquisa de polimorfismos relacionados aos genes rRNA pode ser feita também através de PCR. Na PCR-ribotipagem fragmentos relativos à região que separa as subunidades 16S e 23S são amplificados e a diferenciação se dá com base no número de cópias desses genes e no número de bases que separam as subunidades (KOSTMAN et al., 1992; JENSEN et al., 1993). O método apresenta como principais vantagens: a rapidez; o uso de "primers" universais para qualquer eubactéria; e a necessidade de quantidades pequenas de DNA para a reação de amplificação.

A PCR-ribotipagem pode prover pouca ou nenhuma diferenciação entre as cepas quando empregada para subtipagem de SE (JENSEN et al., 1993; LAGATOLLA et al., 1996; LANDERAS et al., 1998; BAUDART et al., 2000). Porém, alguns pesquisadores (JENSEN & HUBNER, 1996; NASTASI et al., 1997; CHMIELEWSKI et al., 2002) obtiveram perfis diferentes para cepas deste sorotipo.

Outra forma de contornar o problema do elevado número de fragmentos gerados pela REA é através do uso de enzima de restrição de baixa frequência de corte, que permite a obtenção de um número menor de fragmentos a serem analisados. Os fragmentos gerados - de elevado peso molecular - não podem ser separados por eletroforese convencional. Porém, alternando-se a direção do campo elétrico durante a eletroforese é possível separá-los. A análise do perfil de macro-restrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE), método descrito por SCHWARTZ & CANTOR (1984), é um dos mais importantes atualmente utilizados na subtipagem de diversos microrganismos, inclusive *Salmonella*. Suas principais vantagens são seu excelente poder discriminatório, reprodutibilidade e estabilidade dos perfis; porém, é um método complexo, caro, trabalhoso e demorado (MASLOW et al., 1993; FARBER, 1996; OLIVE & BEAN, 1999; LACONCHA et al., 2000).

Quando a PFGE é empregada na subtipagem de cepas de SE, geralmente apresenta excelente desempenho, com bom poder discriminatório e reprodutibilidade (OLSEN et al., 1994; LIEBISCH & SCHWARZ, 1996; LACONCHA et al., 1998; WEIDE-BOTJES et al., 1998; GARAIZAR et al., 2000; LACONCHA et al., 2000).

Em poucos trabalhos a PFGE apresentou poder discriminatório abaixo do esperado para cepas do sorotipo Enteritidis (THONG et al., 1995; BOONMAR et al., 1998; LUKINMAA et al., 1999), sendo apontada como fator determinante a origem altamente clonal das cepas deste sorotipo (THONG et al., 1995).

Devido à estabilidade dos perfis gerados e ao seu poder discriminatório, o método se mostra adequado para a criação de bases de dados, uma tendência atual na pesquisa epidemiológica (OLIVE & BEAN, 1999; LACONCHA et al., 2000). As bases de dados podem armazenar os perfis genéticos submetidos, permitindo um acompanhamento epidemiológico não apenas em escala regional, mas também a

nível nacional ou internacional. Neste contexto foi criado na América do Norte, por exemplo, o banco de dados PulseNet (SWAMINATHAN et al., 2001).

O RAPD ("random amplified polymorphic DNA", polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente) é um método genético para subtipagem baseado na PCR (WELSH & MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990) e tornou-se importante por sua excelente capacidade discriminatória, simplicidade e rapidez. A PCR utilizada neste método emprega "primers" curtos com seqüência de bases aleatória e menor temperatura de pareamento, conferindo menor especificidade à reação. O método tem sido utilizado na subtipagem de SE, sendo sempre considerado simples, rápido e eficiente (FADL et al., 1995; LIN et al., 1996; MILLEMANN et al., 1996; LING et al., 1998; LACONCHA et al., 1998; LANDERAS et al., 1998; SOTO et al., 1999; MARÉ et al., 2001). Além disso, o custo de implementação da técnica, referente a aquisição de equipamentos e modificações no laboratório, é menor que para outros métodos (OLIVE & BEAN, 1999).

O problema principal do RAPD está relacionado à sua fraca reprodutibilidade (MASLOW et al., 1993; FARBER, 1996; HILTON et al., 1997; TYLER et al., 1997; LANDERAS & MENDOZA, 1998; OLIVE & BEAN, 1999). Fatores que podem causar variação nos perfis obtidos incluem a pureza e seqüência de bases do "primer" usado, a origem e atividade da *Taq* DNA polimerase, pequenas variações na mistura de PCR, temperatura de pareamento utilizada e o emprego de diferentes modelos ou marcas de termocicladores (MEUNIER & GRIMONT, 1993; FARBER, 1996; HILTON et al., 1997; GARAIZAR et al., 2000). Assim, o método exige técnicos bem treinados, extrema atenção, equipamentos precisos e calibrados, além de reagentes de excelente qualidade. Porém, diversos estudos (LIN et al., 1996; HILTON et al., 1996; LACONCHA et al., 1998; LANDERAS et al., 1998; SOTO et al., 1999)

demonstram que o método pode ser reprodutível sob condições cuidadosamente controladas.

O RAPD, apesar de suas limitações, parece ser mais apropriado a comparações de genomas muito similares e é suficientemente sensível para detectar pequenos rearranjos no DNA genômico (RALPH & McCLELLAND, 1998). As análises que envolvem restrição enzimática têm sido úteis na diferenciação de genomas que apresentam maior grau de diferença entre si, sendo que cada método gera informações diferentes e complementares entre si (LIU & SANDERSON, 1995; RALPH & McCLELLAND, 1998). Para estudos comparativos entre métodos e para a rotina laboratorial PFGE e ribotipagem são considerados métodos de referência por suas características de tipabilidade, reprodutibilidade, poder discriminatório e estabilidade dos perfis gerados (OLIVE & BEAN, 1999; MILLEMANN et al., 1996).

Devido à origem altamente clonal do sorotipo Enteritidis - que torna tão difícil sua diferenciação - e à variedade de métodos disponíveis e variabilidade de suas características e dos resultados obtidos com cada um, seria imprudente utilizar apenas um método de subtipagem para avaliar a diversidade de isolados deste sorotipo.

OSCAR (1998) e LIEBANA et al. (2001) recomendam o uso de mais de um método que permitam avaliar diferentes aspectos do polimorfismo do DNA ao se estudar a relação epidemiológica entre os isolados, obtendo-se assim maior poder discriminatório e maior confiança nos resultados.

Na literatura não se encontram dados conclusivos sobre qual o método mais apropriado para a tipagem molecular das cepas isoladas de aves e seu ambiente de produção. Assim, este trabalho pode contribuir para que se tenham mais informações a respeito da origem das cepas de SE brasileiras e para verificar se algum dos métodos se mostra mais apropriado à subtipagem destas cepas.

2. OBJETIVOS

- Estudar a disseminação de subtipos de *Salmonella* Enteritidis nas diversas etapas de uma cadeia de produção industrial de frango.
- Pesquisar, nas cepas bacterianas, a presença e frequência de marcadores epidemiológicos importantes.
- Comparar os resultados dos métodos de tipagem, de forma a verificar se algum deles apresenta melhor capacidade discriminatória.
- Analisar a correlação entre características genéticas e fenotípicas dos isolados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

A coleta de amostras para pesquisa de *Salmonella* foi conduzida em quatro etapas, em dois períodos entre fevereiro e abril (meses quentes ou de verão) e outros dois entre julho e setembro (meses frios ou de inverno), nos anos de 2002 e 2003. As amostras foram coletadas desde o aviário até o produto final (cortes congelados de frango, armazenados por sete dias) produzido em um frigorífico do estado de Santa Catarina. Cada grupo de amostras corresponde a lotes individuais de cada produtor avícola (integrado) representantes de sete sub-regiões (R1 a R7) próximas ao frigorífico. Na figura 1 tem-se a representação esquemática do fluxograma da cadeia de produção, com os diferentes pontos amostrados.

A seleção dos integrados foi feita com base na localização geográfica equidistante entre eles, de forma a se obter informações sobre a diversidade e distribuição dos diferentes perfis genéticos na região. A coleta de amostra dos integrados foi realizada por suabe de arrasto no chão do aviário quando os frangos estavam com aproximadamente 20 dias (P1). O transporte foi monitorado após a descarga dos animais, através de suabe do chão dos engradados (P2) antes da lavagem destes e também da coleta da água de lavagem dos engradados (P3). Na descarga das aves foram coletadas amostras de penas e suabe de cloaca (P4) de 10 frangos, sendo um frango por gaiola. Após a depenagem (P6), antes (P7) e após (P9) o resfriamento e após congelamento por sete dias (P11) se fez o enxágüe, com água peptonada tamponada (APT), de três carcaças por ponto. Adicionalmente foram coletados suabes de ambiente (P5) e equipamentos (P10), antes e depois do abate, respectivamente, e uma amostra da água de resfriamento (P8).

Figura 1. Representação esquemática da cadeia de produção industrial de frango congelado, indicando os pontos de coleta de amostras.

A pesquisa de *Salmonella* nas amostras foi feita nos laboratórios do frigorífico de acordo com metodologia padronizada no local e descrita a seguir. As amostras foram submetidas a pré-enriquecimento em APT (Oxoid ou Merck) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após, 0,1mL foi transferido para o centro de uma placa de petri contendo ágar Rapaport-Vassiliadis modificado (MSRV) (Oxoid ou Merck), que foi incubada a 42°C por 24 a 48. A partir das placas com crescimento característico procedeu-se à identificação bioquímica com kit API 20E (BioMérieux) e sorotipagem com anti-soro polivalente grupo D (Probac).

Os isolados confirmados como *S. Enteritidis* foram mantidos sob refrigeração em meio ágar nutritivo e enviados para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, onde foi

dado seguimento às análises. Todos os isolados foram replicados e estocados a -70°C em caldo tripticase de soja (TSB) (Oxoid) adicionado de 20% de glicerol.

Nesta pesquisa foram isoladas duas salmonelas do sorotipo Senftenberg, que foram utilizadas para avaliar a capacidade dos métodos genéticos em diferenciarem-nas das do sorotipo Enteritidis.

Todos os isolados foram enviados para laboratório de referência (IOC/FIOCRUZ, RJ, Brasil) para confirmação da sorologia e realização da fagotipagem.

Cepas de *Escherichia coli* ATCC25922 e *Salmonella* Enteritidis ATCC13076 da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos (FCF-USP) foram utilizadas como controles externos (“outgroups”) na subtipagem genética.

3.2. Perfil de resistência a antimicrobianos

A resistência a antimicrobianos foi testada em ágar Mueller Hinton (Oxoid) pelo método de Kirby-Bauer de difusão com disco (BAUER et al., 1966), utilizando as recomendações do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) americano (FERRARO, 2002), frente aos seguintes antimicrobianos: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), cefotaxima (30µg), ceftazidima (30µg), ciprofloxacina (5µg), cloranfenicol (30µg), enrofloxacina (5µg), furazolidona (15µg), imipenem (10µg), sulfametoxazol+trimetoprima (25µg) e tetraciclina (30µg) (Oxoid).

Para a determinação do perfil de resistência de cada isolado foi considerada categoria de resistência (resistente, intermediária, sensível) apresentada para cada antimicrobiano.

3.3. Análise do perfil de macro-restrição do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Para o método de PFGE foi usado o protocolo proposto pelo "The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance" (PulseNet) (CDC, 1999, 2000).

Para cada cepa, a partir do crescimento obtido em 24h de incubação em ágar infusão cérebro coração (BHI) (Becton, Dickinson and Company), foi preparada uma suspensão de células em tampão de suspensão de células (CSB; 100mM Tris-HCl [USB Corporation], 100mM EDTA [USB Corporation], pH 8) com absorbância em 610nm (A_{610nm}) de aproximadamente 1,35 (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech). Para cada 200 μ L desta suspensão de células foram adicionados 10 μ L de uma solução (20mg/mL) de proteinase K (USB Corporation) e 200 μ L de agarose SeaKem Gold (Cambrex Bio Science Rockland) 1% em tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8) contendo 1% de SDS. Essa mistura foi transferida para moldes reutilizáveis de aproximadamente 400 μ L (Bio-Rad), para formatação dos blocos. Após a solidificação dos blocos, os mesmos foram transferidos para tubo contendo 5mL de tampão de lise celular (CLB; 50mM Tris-HCl, 50mM EDTA, pH 8, 1% sarcosil [Sigma]) e 25 μ L de solução (20mg/mL) de proteinase K e incubados a 54°C por 2h, sob agitação (175rpm). Em seguida os blocos foram lavados duas vezes com água destilada deionizada pré-aquecida a 50°C e incubados por 15 minutos a 50°C sob agitação (175rpm), e outras quatro vezes com tampão TE pré-aquecido a 50°C e incubados por 15 minutos a 50°C sob agitação (175rpm) entre as lavagens. Os blocos preparados foram armazenados a 4°C em tubos contendo 1mL de tampão TE.

Cada bloco foi cortado, com auxílio de duas espátulas, em pedaços de aproximadamente 1/6 do tamanho do bloco. Dois destes pedaços foram submetidos,

separadamente, à restrição com 25U das enzimas Xba I e Spe I (Amersham Biosciences), durante 1h30min em banho a 37°C, e aplicadas em gel de agarose SeaKem Gold 1% em tampão 0,5X TBE (45mM Tris base [USB Corporation], 45mM ácido bórico [USB Corporation], 1mM EDTA, pH8). O marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG marker (New England Biolabs, USA) foi utilizado como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos. A eletroforese foi realizada em uma cuba CHEF DRII (Bio-Rad) nas seguintes condições: tempo inicial de pulso 2,2s; tempo final de pulso 63,8s; voltagem 200V (6V/cm); e tempo de corrida 18h. Após, o gel foi corado em solução de brometo de etídio 1µg/mL (Pharmacia Biotech) (DILLON et al., 1985) por 20 minutos e a imagem registrada com o sistema EDAS120 (Eastman Kodak), sob transiluminação UV 302nm (MacroVue, Pharmacia LKB).

3.4. Análise do polimorfismo de DNA amplificado aleatoriamente (RAPD)

O DNA total foi extraído usando-se o kit Genomic Prep Cells and Tissue DNA Isolation (Amersham Biosciences) conforme instruções do fabricante e a concentração de DNA no extrato foi determinada por espectrofotometria (A_{260nm} e A_{280nm}) conforme SAMBROOK et al. (1989).

Para a reação de amplificação foi utilizado o kit Ready-To-Go RAPD Analysis Beads (Amersham Biosciences), que apresenta os componentes necessários para reações individuais (exceto "primer") em forma de "pellets" desidratados. As reações foram feitas com 25pmol de "primer" (OPB17 [5' AGG GAA CGA G 3'] ou 23L [5' CCG AAG CTG C 3'] [Invitrogen] [LIN et al., 1996]) e aproximadamente 10ng de DNA total em um volume final de 25µL. Os tubos foram termociclados (GeneAmp PCR System 9600; Perkin Elmer) seguindo o programa: 95°C por 5min; 45 ciclos de 95°C por 1min, 36°C por 1min e 72°C por 2min; terminando com resfriamento a 4°C.

Os fragmentos amplificados foram adicionados de 15% (v/v) de tampão para eletroforese ("loading buffer") (SAMBROOK et al., 1989) e separados por eletroforese em gel de agarose NA 1% (Amersham Biosciences) em TBE 1X (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA; pH 8,0) (SAMBROOK et al., 1989). O marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (New England Biolabs) foi utilizado como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos. As imagens dos géis foram registradas usando o sistema EDAS120, sob transiluminação UV 302nm, depois de corados em solução de brometo de etídio 1µg/mL por 20min. O DNA extraído de alguns isolados foi submetido à PCR em dois dias diferentes para verificar a reprodutibilidade do método.

3.5. Ribotipagem

A sonda de 1,3kb para o gene 16S rRNA foi preparada por PCR, como descrito por PELKONEN et al. (1994), usando DNA de *E. coli* ATCC25922 extraído conforme apresentado no item 3.4. A reação foi feita em 25µL, utilizando o kit PuRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences), com 25pmol de cada um dos "primers" PELK1 (5' TTC GAG CTC AGA TTG AAC GCT G 3') e PELK2 (5' ATT GGA TCC ACG ATT ACT AGC G 3') (Invitrogen), 50ng de DNA e o programa: 94°C por 5min; 25 ciclos de 94°C por 1min, 56°C por 1min e 72°C por 2min; 72°C por 5min; e resfriamento a 4°C. O produto da reação foi adicionado de 15% (v/v) de tampão para eletroforese e submetido a eletroforese em gel de agarose NA 1% em TBE 1X. O marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (New England Biolabs) foi utilizado como padrão para determinação do peso molecular do fragmento. Depois de corado em solução de brometo de etídio 1µg/mL por 20min, o gel foi observado sob transiluminação UV 302nm e a banda foi extraída com auxílio de bisturi. O fragmento foi purificado usando o kit GFX PCR DNA and Gel Band

Purification (Amersham Biosciences). Parte desta solução com o fragmento purificado foi usada para quantificação, através de eletroforese, usando o marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder como padrão de massa e o sistema EDAS120 para registro da imagem do gel e cálculos.

Para a marcação da sonda e etapas subseqüentes da ribotipagem foi utilizado um marcador não radioativo (ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System, Amersham Biosciences), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA total das cepas foi extraído e quantificado conforme apresentado no item 3.4. A digestão foi feita utilizando 2U da enzima de restrição Pst I (Amersham Biosciences) para cada 1µg de DNA, a 37°C por 1h30min.

Os fragmentos de restrição foram separados por eletroforese em gel de agarose NA 0,8% em 1X TBE. O marcador de peso molecular Lambda DNA *Hind*III Digest (New England Biolabs) foi utilizado como padrão para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos.

O DNA foi transferido do gel para a membrana de nitrocelulose como descrito por SOUTHERN (1975) e SAMBROOK et al. (1989). A transferência do DNA do gel de agarose e as etapas de denaturação, fixação, pré-hibridização e hibridização e detecção foram executadas de acordo com as recomendações do fabricante do kit ECL. Após a reação de detecção, para cada gel, duas folhas de filme (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) foram expostas por 10 e 20 minutos para registro dos padrões de bandas.

Os pesos moleculares dos fragmentos foram estimados a partir da migração do marcador de peso molecular (Lambda DNA-*Hind* III Digest) em uma coluna de cada gel. Antes da etapa de transferência para membrana esta coluna era recortada com auxílio de espátula ou bisturi, corada em brometo de etídio 1µg/mL por 20min e fotografada. Após o registro dos ribotipos nos filmes, estes foram sobrepostos às

imagens impressas, em escala real, da coluna de marcador, para determinação dos pesos moleculares dos fragmentos.

3.6. PCR-Ribotipagem

O DNA total foi extraído e quantificado conforme apresentado no item 3.4. A PCR foi executada de acordo com a técnica apresentada por KOSTMAN et al. (1992).

As reações foram feitas em 25 μ L, utilizando 25pmol de cada um dos "primers" KOST1 (5' TTG TAC ACA CCG CCC GTC A 3') e KOST2 (5' GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C 3') (Invitrogen), aproximadamente 200ng de DNA, 20mM Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1U Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Brasil), dNTP mix (200 μ M de cada) (Fermentas) e o programa: 94°C por 6min; 30 ciclos de 94°C por 1min, 55°C por 1min e 72°C por 1min; 72°C por 3min; e resfriamento a 4°C. O produto da reação foi adicionado de 15% (v/v) de tampão para eletroforese e submetido a eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA; pH 8,0). O marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (New England Biolabs) foi utilizado como padrão para determinação do peso molecular dos fragmentos. As imagens dos géis foram registradas usando o sistema EDAS120, sob transiluminação UV 302nm, depois de corados em solução de brometo de etídio 1 μ g/mL por 20min. O DNA extraído de alguns isolados foi submetido à PCR em dois dias diferentes para verificar a reprodutibilidade do método.

3.7. Análise dos resultados

Os padrões de bandas obtidos para cada método genético foram comparados visualmente e as cepas agrupadas conforme seus perfis genéticos. Os pesos moleculares das bandas foram calculados com o sistema EDAS120. A correlação entre os perfis foi avaliada com auxílio do programa NTSYSpc versão 2.0 (Exeter Software), usando-se coeficiente de similaridade de Dice (DICE, 1945) e análise de "clusters" (dendrograma) UPGMA ("Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average") (SNEATH & SOKAL, 1973).

Os resultados obtidos para cada método foram combinados para a determinação dos subtipos e a diversidade genética das cepas foi correlacionada com a distribuição das mesmas na cadeia de produção.

O poder discriminatório (D) dos métodos de subtipagem foi calculado com base no índice de diversidade de Simpson (SIMPSON, 1949), conforme apresentado por HUNTER & GASTON (1988) e HUNTER (1990).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa de *Salmonella* Enteritidis foi realizada em quatro etapas durante os anos de 2002 e 2003, correspondendo a dois períodos entre fevereiro e abril (meses quentes/verão) e dois períodos entre julho e setembro (meses frios/inverno). Obteve-se um total de 108 isolados, sendo 29 e 22, respectivamente, nas etapas de verão e inverno de 2002 e 24 e 33 isolados, respectivamente, nas etapas de verão e inverno de 2003. Duas cepas de *Salmonella* Senftenberg também foram isoladas a partir das amostras analisadas e foram incluídas no estudo para testar a capacidade dos métodos em diferenciarem-nas das do sorotipo Enteritidis.

A seleção dos pontos de coleta de amostras foi determinada em conjunto com o responsável pela Garantia da Qualidade do frigorífico, sendo incluídos aqueles que, entre os amostrados na rotina de análises do frigorífico, apresentavam maior frequência de isolamento de salmonela. Porém, é importante ressaltar que este trabalho não pretende analisar quantitativamente a incidência de *Salmonella* na cadeia de produção.

Cepas de *S. Enteritidis* foram isoladas em todas as etapas de processamento e a partir de todos os tipos de amostra, conforme pode ser verificado na tabela 1. Também foi possível isolar *S. Enteritidis* a partir de amostras de cada uma das sub-regiões geográficas, sendo isoladas entre 10 e 21 cepas do microrganismo de cada uma das sete sub-regiões avaliadas, conforme pode ser observado na tabela 2.

A fagotipagem foi realizada em laboratório de referência (FIOCRUZ, RJ) para 107 (99,1%) dos 108 isolados. O isolado nº 14 enviado não apresentou crescimento

naquele laboratório, não tendo sido determinado seu fagotipo. Os dados apresentados na tabela 3 permitem verificar que os isolados pertencem apenas aos fagotipos PT4, PT1 e PT7a, formando grupos de 74 (69,2%), 19 (17,8%) e 14 (13,1%) isolados, respectivamente. A fagotipagem apresentou poder discriminatório (*D*) (HUNTER & GASTON, 1988; HUNTER, 1990) igual a 0,478.

Tabela 1. Origem das 108 *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme o tipo de amostra.

Ponto de coleta ^a	Etapa do processamento	Tipo de amostra	Nº de isolados
P1	Integrado	Suabe de arrasto no aviário	5
P2	Recepção	Suabe do engradado	10
P3	Recepção	Água de lavagem de engradado	12
P4	Recepção	Penas do peito, suabe da cloaca	8
P5	Recepção	Suabe do parapeito da pendura	3
P6	Depenagem	Carcaça depenada	12
P7	Resfriamento	Carcaça antes do resfriamento	17
P8	Resfriamento	Água de resfriamento	5
P9	Resfriamento	Carcaça resfriada	22
P10	Embalagem	Suabe de mesa (equipamento)	2
P11	Estoque/Armazenamento	Carcaça congelada por 7 dias	12

^a Consultar figura 1 para localização dos pontos de coleta

O baixo poder discriminatório obtido com a fagotipagem se deve à predominância do fagotipo PT4 e à pequena quantidade de fagotipos encontrados. LACONCHA et al. (1998) também obtiveram, na Espanha, baixo poder discriminatório ao determinar os fagotipos de grupos de *S. Enteritidis* epidemiologicamente relacionadas e não relacionadas, isoladas de alimentos, humanos e ambiente. Segundo os mesmos autores, de um total de 15 cepas isoladas em quatro surtos diferentes apenas duas não pertenciam ao fagotipo PT4. Entre outras 24 cepas não relacionadas o PT4 foi o fagotipo mais comum (62,5%), apesar de terem sido identificados outros quatro fagotipos.

Tabela 2. Origem das 108 S. Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme ponto de coleta e região do integrador.

Cepas	Região	Ponto de coleta ^a	Nº de isolados
1 2 3	R1	Suabe do engradado (P2)	3
4 5 6	R1	Água de lavagem de engradado (P3)	3
7	R1	Penas do peito, suabe da cloaca (P4)	1
8	R1	Carcaça antes do resfriamento (P7)	1
9 10	R1	Carcaça resfriada (P9)	2
Subtotal R1			10
11	R2	Suabe do engradado (P2)	1
12 13	R2	Água de lavagem de engradado (P3)	2
14 15	R2	Suabe do parapeito da pendura (P5)	2
16 17 18	R2	Carcaça depenada (P6)	3
19 20 21 22	R2	Carcaça antes do resfriamento (P7)	4
23 24	R2	Água de resfriamento (P8)	2
25 26 27 28 29	R2	Carcaça resfriada (P9)	5
30	R2	Suabe de mesa (P10)	1
31	R2	Carcaça congelada por 7 dias (P11)	1
Subtotal R2			21
32	R3	Suabe de arrasto no aviário (P1)	1
33	R3	Suabe do engradado (P2)	1
34 35	R3	Água de lavagem de engradado (P3)	2
36	R3	Penas do peito, suabe da cloaca (P4)	1
37 38	R3	Carcaça depenada (P6)	2
39 40	R3	Carcaça antes do resfriamento (P7)	2
41	R3	Água de resfriamento (P8)	1
42 43 44	R3	Carcaça resfriada (P9)	3
45 46 47	R3	Carcaça congelada por 7 dias (P11)	3
Subtotal R3			16
48	R4	Suabe de arrasto no aviário (P1)	1
49 50 51	R4	Suabe do engradado (P2)	3
52 53 54	R4	Água de lavagem de engradado (P3)	3
55 56 57 58 59	R4	Penas do peito, suabe da cloaca (P4)	5
60 61	R4	Carcaça depenada (P6)	2
62 63	R4	Carcaça antes do resfriamento (P7)	2
64 65 66 67	R4	Carcaça resfriada (P9)	4
Subtotal R4			20
68	R5	Suabe de arrasto no aviário (P1)	1
69 70	R5	Água de lavagem de engradado (P3)	2
71 72	R5	Carcaça antes do resfriamento (P7)	2
73	R5	Água de resfriamento (P8)	1
74 75 76	R5	Carcaça resfriada (P9)	3
77	R5	Carcaça congelada por 7 dias (P11)	1
Subtotal R5			10

continua

continuação

Cepas	Região	Ponto de coleta ^a	Nº de isolados
78	R6	Suabe de arrasto no aviário (P1)	1
79 80	R6	Carcaça depenada (P6)	2
81 82 83	R6	Carcaça antes do resfriamento (P7)	3
84 85 86	R6	Carcaça resfriada (P9)	3
87	R6	Suabe de mesa (P10)	1
88 89 90	R6	Carcaça congelada por 7 dias (P11)	3
Subtotal R6			13
91	R7	Suabe de arrasto no aviário (P1)	1
92 93	R7	Suabe do engradado (P2)	2
94	R7	Penas do peito, suabe da cloaca (P4)	1
95	R7	Suabe do parapeito da pendura (P5)	1
96 97 98	R7	Carcaça depenada (P6)	3
99 100 101	R7	Carcaça antes do resfriamento (P7)	3
102	R7	Água de resfriamento (P8)	1
103 104	R7	Carcaça resfriada (P9)	2
105 106 107 108	R7	Carcaça congelada por 7 dias (P11)	4
Subtotal R7			18
Total			108

^a Consultar figura 1 para localização dos pontos de coleta

Há uma variedade de fagotipos encontrados em diferentes estudos, porém cepas do fagotipo PT4 predominam em estudos feitos na Europa e no Brasil. PERESI et al. (1998) e ZANCAN et al. (2000) afirmam que o intercâmbio comercial de matrizes (bisavós) de aves com países da Europa pode ter facilitado a introdução e disseminação destas cepas no Brasil a partir de 1993. Há várias hipóteses para o sucesso de cepas deste fagotipo em se adaptar às aves, sendo que NUNES et al. (2003) ressaltam a importância de cepas deste fagotipo serem mais virulentas. No trabalho de COX (1995) são apresentados os fatores de virulência mais importantes deste fagotipo para a infecção das aves, com destaque para certas estruturas fimbriais.

Quanto à importância do fagotipo PT4 na salmonelose em humanos, há opiniões divergentes. REIS (1994) realizou fagotipagem de cepas de origem humana

e de aves e relata que cepas de origem humana eram predominantemente do fagotipo PT8, enquanto todas as cepas isoladas de aves eram do fagotipo PT4, considerando uma mesma origem geográfica. Isso indicaria a possibilidade de as cepas causadoras de salmonelose em humanos não estarem sendo veiculadas por aves e seus produtos. Por outro lado, NUNES et al. (2003) citam outros estudos em que cepas do fagotipo PT4 estiveram associadas à salmonelose em humanos, sugerindo que existe a correlação entre cepas de origem humana e de aves.

Tabela 3. Distribuição das 107 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os fagotipos encontrados.

Fagotipo	Cepas ^a	Nº de cepas
PT4	1 4 6 8 9 16 17 18 19 20 22 23 24 25 26 27 30 31 33 34 37 40 41 42 43 44 49 50 52 53 54 56 57 58 60 61 64 65 66 67 68 69 71 73 74 75 76 78 79 80 81 82 84 85 86 87 88 89 90 92 93 94 96 97 98 99 100 101 103 104 105 106 107 108	74
PT1	2 3 5 7 10 35 36 38 39 45 46 47 51 59 70 72 77 83 91	19
PT7a	11 12 13 15 21 28 29 32 48 55 62 63 95 102	14
Total		107

^a Consultar tabela 2 para identificação da origem das cepas

As aves usadas neste estudo eram de uma mesma região geográfica e pertenciam a um mesmo sistema de cooperativa (frigorífico e integrados), provavelmente compartilhando um mesmo fornecedor de matrizes ou pintos. Isto pode explicar a pouca variedade de fagotipos, bem como a predominância de cepas do fagotipo PT4.

Cepas dos fagotipos PT1 e PT7a são pouco comuns no Brasil, porém podem ser derivadas do fagotipo PT4, por conversão (THRELFALL et al., 1993; LACONCHA et al., 1998; LING et al., 1998).

Cepas dos três fagotipos foram encontradas em todas as etapas da cadeia produtiva e em todas as sub-regiões, não tendo sido encontrada correlação específica entre nenhum dos fagotipos e sua distribuição na cadeia produtiva.

A detecção de diferentes fagotipos entre as amostras - sem correlação específica com sub-região ou ponto de coleta - pode indicar que as fontes de infecção das aves não se restringem à transmissão vertical, por exemplo, a partir das matrizes de origem européia. A adaptação das cepas ao nicho e região geográfica estudados pode contribuir para sua disseminação nestes, com possível reinfecção das aves a partir de fontes ambientais ou outras fontes relacionadas especificamente a esta região.

Os perfis de resistência a antimicrobianos foram determinados para as 108 cepas de *S. Enteritidis* frente a antimicrobianos recomendados pelo CLSI (ampicilina, ciprofloxacina, sulfametoxazol+trimetoprima, cloranfenicol e ceftazidima), além daqueles em uso (enrofloxacina) e/ou de uso proibido (ampicilina, sulfametoxazol+trimetoprima, cloranfenicol, tetraciclina e furazolidona) em prevenção/terapêutica veterinária (BRASIL, 2005a, 2005b; SILVA, 2001, comunicação pessoal). Empregaram-se também outros agentes representantes de outras classes de antimicrobianos de importância para Enterobactérias (amicacina, cefotaxima, cefoxitina e imipenem).

Entre as 108 cepas de *S. Enteritidis*, foram identificados 21 diferentes perfis de resistência a antimicrobianos (A1 a A21), com uma a 34 cepas cada (tabela 4). Os perfis A1 a A20 agruparam 101 (93,5%) cepas resistentes ou com resistência intermediária. Apenas sete (6,5%) cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos

Tabela 4. Distribuição das 108 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os 21 perfis de resistência a antimicrobianos.

Perfil de resistência a antimicrobianos	Perfil de resistência ^a	Cepas ^b	Nº de cepas
A1	Enr	17 23 27 37	4
A2	Enr (Cip)	25	1
A3	Enr (Fr)	2 43 44 46 58 93 103 107	8
A4	Enr (CipFr)	47 101	2
A5	Enr (CipTe)	26	1
A6	EnrFr	35	1
A7	EnrFr (Fox)	94	1
A8	EnrFr (AmpCipC)	95	1
A9	EnrFr (CipFoxTe)	82	1
A10	Fox (EnrFr)	68	1
A11	FoxFr (Enr)	80	1
A12	Fr	24 28 29 30 48 59	6
A13	Fr (Enr)	1 7 40 92 97	5
A14	Fr (EnrFox)	4	1
A15	Cip (EnrFr)	54	1
A16	AmpFr (EnrFox)	3	1
A17	(Enr)	5 6 12 36 41 52 60 61 63 65 67 70 72 77 81 83 96 98 106 108	20
A18	(EnrFr)	8 9 14 16 19 31 32 33 34 38 42 45 49 50 53 55 56 57 62 64 75 76 78 79 84 85 88 89 90 91 99 100 104 105	34
A19	(Fr)	11 13 15 18 20 21 51 69 73 74	10
A20	(CtxEnrFrTe)	87	1
A21	Multi-sensível	10 22 39 66 71 86 102	7
Total			108

^a Perfis entre parênteses = cepas com resistência intermediária ao(s) antimicrobiano(s); Amp = ampicilina (10µg); C = cloranfenicol (30µg); Cip = ciprofloxacina (5µg); Ctx = cefotaxima (30µg); Enr = enrofloxacin (5µg); Fox = ceftiofona (30µg); Fr = furazolidona (15µg); Te = tetraciclina (30µg); multi-sensível = sensível a todos os antimicrobianos acima, além de amicacina (30µg), ceftazidima (30µg), imipenem (10µg), sulfametoxazol+trimetoprima (25µg) e tetraciclina (30µg).

^b Consultar tabela 2 para identificação da origem das cepas.

testados (perfil A21), sendo que entre as restantes, 36 (33,3%) foram resistentes a um ou dois antimicrobianos e um total de 90 (83,3%) apresentaram resistência intermediária a até quatro antimicrobianos.

Conforme pode ser verificado na tabela 5, um total de 85 (78,7%) das 108 cepas apresentou resistência intermediária ou foram resistentes à enrofloxacina (perfis A1 a A11, A13 a A18 e A20) (tabela 4), 75 (69,4%) à furazolidona (perfis A3, A4, A6 a A16 e A18 a A20) (tabela 4) e sete (6,5%) à ciprofloxacina (perfis A2, A4, A5, A8, A9 e A15) (tabela 4). Cefoxitina, ampicilina, tetraciclina, cefotaxima e cloranfenicol são outros antimicrobianos frente aos quais foi detectada resistência ou resistência intermediária. Todos os 108 isolados foram sensíveis a amicacina, ceftazidima, imipenem e sulfametoxazol+trimetoprima.

Tabela 5. Distribuição das 108 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os as três categorias de resistência frente a 12 antimicrobianos.

Antimicrobianos	Número de cepas		
	Resistentes	Intermediárias	Sensíveis
Enrofloxacina (5µg)	20	65	23
Furazolidona (15µg)	18	57	33
Cefoxitina (30µg)	2	4	102
Ciprofloxacina (5µg)	1	6	101
Ampicilina (10µg)	1	1	106
Tetraciclina (30µg)	0	3	105
Cefotaxima (30µg)	0	1	107
Cloranfenicol (30µg)	0	1	107
Outros ^a	0	0	108

^a Outros: amicacina (30µg), ceftazidima (30µg), imipenem (10µg) e sulfametoxazol+trimetoprima (25µg).

As duas cepas de *S. Senftenberg*, usadas como controles, também foram testadas frente a todos os antimicrobianos, sendo que uma delas apresentou resistência intermediária a cloranfenicol e tetraciclina e a outra foi sensível a todos os antimicrobianos testados.

A frequência relativamente alta de cepas resistentes encontrada neste estudo não era esperada. A resistência a agentes antimicrobianos em cepas do sorotipo Enteritidis vem aumentando, sobretudo em isolados clínicos de origem humana, porém ainda é relatada como sendo rara se comparada à observada em salmonelas de outros sorotipos, como o Typhimurium (PERESI et al., 1999; HAKANEN et al., 2001; SILVA & DUARTE, 2002; VARMA et al., 2005).

Apesar disso, em estudos feitos no Brasil com cepas de *S. Enteritidis* de diversas origens tem sido detectada resistência a uma ampla gama de antimicrobianos, tendo sido relatada inclusive a existência de cepas com resistência múltipla (NUNES, 1999; OLIVEIRA, 2005).

NUNES (1999) analisou 278 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de diversas origens, incluindo alimentos, animais, homem e ambiente de avicultura quanto à resistência frente a 28 antimicrobianos. Apesar de apenas 9,2% das cepas terem apresentado resistência, foi detectado um perfil de resistência a nove drogas em cepa isolada de frango e perfis com resistência a até oito drogas foram detectados em cepas isoladas de alimentos e de origem humana.

OLIVEIRA et al. (2005), em um trabalho com cepas de origem humana e relacionadas a alimentos isoladas no sul do Brasil, detectaram níveis de resistência semelhantes aos obtidos neste estudo. Apenas 9,9% de 91 cepas analisadas foram sensíveis aos 12 antimicrobianos utilizados e as demais foram distribuídas em outros 18 perfis de resistência, incluindo uma cepa resistente a sete antimicrobianos.

ROSAS et al. (2005) apresentaram um trabalho no XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia com os resultados de um estudo de avaliação de perfil de sensibilidade de *S. Enteritidis* isoladas de cortes e produtos de frango frente a 23 antimicrobianos. Dos 38 isolados testados 57,9% apresentaram resistência a uma ou a até quatro drogas.

Os dados obtidos por OLIVEIRA et al. (2005) e por ROSAS et al. (2005), assim como os obtidos neste trabalho, se referem a cepas isoladas recentemente, podendo indicar uma mudança acentuada no perfil de resistência das *S. Enteritidis*. Apesar de não haver informações sobre origem geográfica dos isolados utilizados por ROSAS et al. (2005), há que se considerar também a origem geográfica relativamente próxima das amostras analisadas no trabalho de OLIVEIRA et al. (2005) e neste, o que permite supor a possibilidade de outros tipos de relação entre elas. Aves com mesma origem genética ou obtidas de um mesmo fornecedor, por exemplo, poderiam ter sido expostas às mesmas substâncias e/ou níveis de agentes de pressão seletiva.

A disseminação de cepas resistentes à enrofloxacina e o grande número de cepas com resistência intermediária, podem ser usados como indicativos do uso inadequado deste antimicrobiano, ainda que de acordo com as normas legais vigentes, seja na prevenção ou na terapêutica veterinária. A enrofloxacina vem sendo efetivamente usada no Brasil e em outros países na terapêutica veterinária e a resistência intermediária reforça a hipótese de que a pressão atuante sobre o microrganismo estaria selecionando cepas resistentes.

O uso veterinário de furazolidona, cloranfenicol (BRASIL, 2005b) e tetraciclina (SILVA, 2001, comunicação pessoal) foi proibido no Brasil. A resistência ou resistência intermediária a estes antimicrobianos encontrada na presente pesquisa pode ser explicada por diversas hipóteses. Pode sugerir uma marca genética antiga;

pode sugerir o uso ilegal destes antimicrobianos; ou seria decorrente de pressão ambiental devida à contaminação do ambiente de criação das aves, ao longo de anos de uso das drogas na avicultura. Esta última hipótese é especialmente reforçada pelo elevado número de cepas com resistência intermediária à furazolidona, que podem estar se tornando menos resistentes devido a não estarem mais sendo expostas a essa droga. Porém isso somente poderia ser comprovado com dados retrospectivos de resistência a antimicrobianos de cepas de mesma origem - geográfica, inclusive -, os quais não estão disponíveis.

Uma quarta hipótese pode ser levantada, levando a um raciocínio inverso: a possibilidade de estarem sendo fornecidas aos animais, via ração, substâncias como anticoccidianos ou anti-helmínticos, por exemplo, que possuam grupamentos químicos similares aos dos antimicrobianos e, dessa forma, contribuindo para o surgimento de resistência cruzada com estes. Assim, o número elevado de cepas com resistência intermediária à furazolidona seria considerado um indicativo do aumento - e não diminuição - dos níveis de resistência a este antimicrobiano.

O problema da resistência a antimicrobianos é preocupante devido a certos aspectos clínicos da salmonelose em humanos. Infecções por *Salmonella* normalmente são autolimitadas, sendo o tratamento com antimicrobianos recomendado apenas em casos mais severos da doença. Porém, tem-se um problema sério de saúde pública se este recurso se mostrar inefetivo quando for preciso utilizá-lo (HAKANEN et al., 2001).

Neste estudo se verificaram proporções desiguais de cepas resistentes às fluoroquinolonas. Apenas uma pequena proporção das cepas resistentes ou com resistência intermediária a enrofloxacin também foram resistentes ou apresentaram resistência intermediária a ciprofloxacina. Por outro lado, como pode ser observado na tabela 4, todas as cepas com resistência intermediária - nºs 25 (A2), 26 (A5), 47

(A4), 82 (A9), 95 (A8) e 101 (A4) - e a única cepa resistente - nº 54 (A15) - a ciprofloxacina, apresentaram resistência ou resistência intermediária a enrofloxacin.

Uma maior correlação entre resistência às fluoroquinolonas poderia ser esperada pelo fato de o mecanismo de aquisição de resistência, uma mutação em duas etapas, ser igual para as drogas desta classe. Entretanto, o número de isolados resistentes à enrofloxacin foi bastante superior ao dos resistentes à ciprofloxacina. Isto pode ser explicado, em parte, com base em trabalhos como o de AARESTRUP et al. (2003), que sugerem a necessidade de revisão dos padrões de classificação de Enterobactérias quanto à resistência frente às fluoroquinolonas. Estes autores afirmam que seria importante rever os padrões de classificação da resistência à ciprofloxacina, de forma a aproximá-los de seu equivalente veterinário enrofloxacin.

Uma limitação desta avaliação está relacionada ao método empregado. Apesar do método de difusão com disco utilizado no presente estudo ser uma importante ferramenta de monitoramento da resistência, o uso do método de determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), seria necessário para resultados mais precisos quanto à sensibilidade dos microrganismos em relação aos antimicrobianos.

É importante observar que a ciprofloxacina é o antimicrobiano de primeira escolha no tratamento clínico de diarreias por salmonelas não-tifóides em humanos e que entre as sete cepas resistentes à ciprofloxacina, quatro foram isoladas a partir de carcaças em processamento e uma foi isolada a partir de corte de frango congelado, produto final do processamento no frigorífico. Assim, do ponto de vista da saúde pública é extremamente preocupante a detecção de resistência a esta droga em salmonelas presentes em alimentos.

Dados de distribuição dos perfis de resistência ao longo da cadeia produtiva devem ser analisados com cautela, pois este método se mostra pouco confiável para o rastreamento de cepas com origens diferentes. Há possibilidade de ocorrer transferência horizontal de material genético, com expressão de características que não representam origem comum (TENOVER et al., 1997).

Dentre as 16 cepas resistentes ou com resistência intermediária exclusivamente à furazolidona (perfis A12 e A19), 10 (62,5%) foram isoladas de amostras coletadas na região R2. Esta foi a única correlação possível de se verificar entre perfis de resistência e regiões dos integrados.

Não há como relacionar o uso de antibióticos ou outros adjuvantes de crescimento no sistema produtivo avaliado com a resistência observada nas cepas, uma vez que de acordo com o frigorífico os mesmos não são por eles empregados.

Os métodos de PFGE, RAPD, ribotipagem e PCR-ribotipagem foram usados para determinar os subtipos genéticos (genótipos) das 108 cepas de *S. Enteritidis* e às duas cepas de *S. Senftenberg*. A seguir apresentam-se os resultados obtidos com cada um destes métodos.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Porções dos blocos de agarose contendo DNA íntegro foram submetidas à restrição com as enzimas *Xba* I e *Spe* I e à eletroforese em campo pulsado. Conforme pode ser observado na figura 2, com a enzima *Xba* I foram obtidos para as cepas de *S. Enteritidis* deste estudo dois perfis (X1 e X2), respectivamente com 12 e 13 fragmentos variando entre 30,9kb e 938,5kb. Um terceiro perfil (SS) foi obtido para as duas cepas de *S. Senftenberg* e foi possível obter perfis diferentes

também para a cepa de *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e para a cepa de *Escherichia coli* ATCC25922 (EC), utilizadas como controles externos ("outgroups"). O poder discriminatório obtido com esta enzima foi muito baixo ($D=0,055$), sendo que entre 108 cepas de *S. Enteritidis*, 105 apresentaram o perfil X1 e apenas três (cepas 84, 85 e 89) apresentaram o perfil X2 (tabela 6).

Figura 2. Perfis PFGE obtidos com as enzimas de restrição Xba I e Spe I para 108 cepas de *S. Enteritidis* (X1, X2, S1, S2) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, *S. Senftenberg* (SS), *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e *E. coli* ATCC25922 (EC); PM = marcador de peso molecular Lambda Ladder PFG marker (New England Biolabs).

O protocolo adotado prevê que no caso da enzima Xba I não prover suficiente diferenciação entre as cepas testadas deve ser feita a tipagem com uma enzima adicional. Assim sendo, a enzima Spe I também foi utilizada para a tipagem das cepas, tendo a escolha das enzimas sido feita com base no protocolo adotado para este método (CDC, 1999, 2000).

provavelmente, à incapacidade da enzima Spe I em diferenciá-la das cepas com perfil S1 (figura 2). Assim, em estudos futuros, seria recomendável testar outras enzimas, de forma a identificar alguma capaz de prover esta diferenciação.

Figura 3. Representação da correlação entre os três perfis PFGE obtidos com as enzimas de restrição Xba I e Spe I para 108 cepas de *S. Enteritidis* (PFGE1, PFGE2 e PFGE3) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, *S. Senftenberg* (SS), *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e *E. coli* ATCC25922 (EC).

Além de ter apresentado baixo poder discriminatório e não ter diferenciado uma cepa não relacionada, o método se mostrou trabalhoso e demorado. O equipamento para eletroforese de campo pulsado é caro e normalmente não está disponível na maioria dos laboratórios. Por outro lado, com ambas as enzimas utilizadas, os padrões de bandas foram claros e estáveis, e o poder discriminatório pode ser aumentado com o uso de enzima adicional.

Mais dados a respeito de perfis PFGE de *S. Enteritidis* isoladas no Brasil deverão estar disponíveis em breve, pois o Instituto Adolfo Lutz recentemente

passou a integrar a Rede PulseNet América Latina (SWAMINATHAN et al., 2001; FERNANDES et al., 2005). Porém, até o momento, o trabalho de MATSUOKA et al. (2004) parece ser o único publicado a usar PFGE para subtipar cepas de *S. Enteritidis* isoladas no Brasil. Estes pesquisadores usaram PFGE com a enzima Xba I para subtipar sete cepas de *S. Enteritidis* isoladas de pacientes do Hospital das Clínicas (HC-FM-USP), em São Paulo, e de uma cepa isolada de dieta enteral liofilizada, obtendo um mesmo perfil PFGE para todas elas.

A enzima Not I foi usada por OLSEN et al. (1994) para subtipar por PFGE 62 cepas de *S. Enteritidis* de origem humana, de frangos e de outras origens. Conforme o método de interpretação dos padrões de bandas, as cepas puderam ser alocadas em 10 ou 15 perfis PFGE, mas os autores não analisam o poder discriminatório (D).

LIEBISCH & SCHWARZ (1996) usaram PFGE para subtipar 31 cepas de *S. Enteritidis* não relacionadas, isoladas ao longo de 12 anos (1982 a 1994) na Alemanha, a partir de amostras de frango, de humanos, de suínos, de bovinos e de cão. Pela combinação dos resultados obtidos com as enzimas Xba I, Spe I e Not I obtiveram nove perfis PFGE e poder discriminatório $D=0,815$.

WEIDE-BOTJES et al. (1998) subtiparam por PFGE, também com as enzimas Xba I, Spe I e Not I, 76 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de animais, alimentos e humanos, entre 1991 e 1996, na Alemanha. O poder discriminatório obtido pela combinação dos resultados das três enzimas foi $D=0,892$, com diferenciação das cepas em 26 perfis.

LUKINMAA et al. (1999) analisaram na Finlândia, por PFGE, 100 cepas de *S. Enteritidis* dos fagotipos PT1 e PT4, isoladas entre 1991 e 1998 de humanos, animais (frango e gado) e alimentos envolvidos ou não em surtos ocorridos naquele país. A enzima Xba I permitiu diferenciar as 57 cepas do fagotipo PT1 em sete perfis PFGE e as 43 cepas PT4 também em sete perfis, porém algumas cepas de

fagotipos diferentes apresentaram perfis PFGE idênticos. Para algumas cepas também foram determinados os perfis PFGE com as enzimas Spe I e Not I, porém os autores afirmam que o poder discriminatório obtido com estas enzimas foi inferior ao obtido com a Xba I.

LACONCHA et al. (2000) obtiveram poder discriminatório elevado ($D=0,802$) pela combinação de resultados obtidos para 101 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de animais, alimentos e humanos em quatro países europeus, com PFGE usando as enzimas Xba I, Bln I e Spe I.

A diversidade genética maior observada nos estudos citados já poderia ser esperada, pois incluem cepas de diferentes origens geográficas. Porém, outros trabalhos, apresentados a seguir, encontraram perfis PFGE idênticos mesmo para cepas sem relação geográfica ou outra relação epidemiológica.

THONG et al. (1995) usaram as enzimas Xba I, Spe I e Avr II para subtipar por PFGE 61 cepas de *S. Enteritidis*, sendo parte delas isolada de humanos na Malásia e outra parte de origem humana e de frangos de diversas fazendas da Suíça. Combinando os resultados obtidos para as três enzimas obtiveram nove perfis diferentes que diferiam apenas por uma ou duas bandas para cada enzima. Um dos perfis PFGE estava presente tanto nas cepas isoladas de frango como nas de humanos da Malásia e da Suíça.

BOONMAR et al. (1998) analisaram na Tailândia, entre 1990 e 1997, 53 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de humanos e de carne e fezes de frango. Nove perfis PFGE foram obtidos pela digestão com a enzima Bln I, porém 84,9% das cepas apresentaram um mesmo perfil. Estas 45 cepas foram submetidas à digestão com a enzima Xba I, apresentando também um único perfil.

O DNA total extraído de cada cepa foi quantificado e diluído para ser submetido à PCR com os "primers" OPB17 e 23L. Estes "primers" foram selecionados por terem apresentado bons resultados em um estudo com *S. Enteritidis* publicado por LIN et al. (1996). O "primer" OPB17 permitiu dividir as 108 cepas de *S. Enteritidis* em dois perfis (O1 e O2) (figura 4), ambos com seis fragmentos variando entre 376pb e 1675pb. As duas cepas de *S. Senftenberg* apresentaram um terceiro perfil (SS). Também foi possível diferenciar as cepas de *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e de *Escherichia coli* ATCC25922 (EC). O poder discriminatório (*D*) obtido foi de 0,214, com 95 das 108 cepas de *S. Enteritidis* apresentando perfil O1 e 13 apresentando perfil O2 (tabela 7).

Figura 4. Perfis RAPD obtidos com os "primers" OPB17 e 23L para 108 cepas de *S. Enteritidis* (O1, O2, L1, L2) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, *S. Senftenberg* (SS), *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e *E. coli* ATCC25922 (EC); CN = controle negativo (água deionizada estéril), PM = marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (New England Biolabs).

Tabela 7. Distribuição das 108 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os três perfis RAPD obtidos com os "primers" OPB17 e 23L.

Perfil OPB17	Perfil 23L	Perfil RAPD	Cepas ^a	Nº de cepas
O1	L1	RAPD1	2 3 5 6 7 9 10 11 12 13 15 16 18 19 20 21 22 24 28 29 30 32 33 34 35 36 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108	94
O2	L1	RAPD2	1 4 8 14 17 23 25 26 27 31 37 38 83	13
O1	L2	RAPD3	96	1

^a Consultar tabela 2 para identificação da origem das cepas

Foram obtidos também dois perfis (L1 e L2) com o "primer" 23L (figura 4) para as 108 cepas de *S. Enteritidis*. Estes perfis apresentaram 6 e 10 fragmentos, respectivamente, variando de 288pb a 1943pb. As cepas de *S. Senftenberg* (SS) e de *Escherichia coli* ATCC25922 (EC) também puderam ser diferenciadas, porém a cepa de *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) apresentou perfil idêntico ao perfil L1. O poder discriminatório obtido com este "primer" foi extremamente baixo ($D=0,019$), com apenas uma das 108 cepas de *S. Enteritidis* apresentando perfil L2 e as 107 restantes pertencendo ao perfil L1 (tabela 7).

Os perfis obtidos com os "primers" OPB17 e 23L foram combinados para se obter um perfil RAPD (tabela 7). O poder discriminatório ($D=0,230$) obtido com a combinação foi maior que o obtido com cada "primer" isoladamente.

A correlação entre os perfis RAPD é apresentada na figura 5. Assim como o PFGE, este método permitiu diferenciar a cepa de *S. Enteritidis* ATCC13076, porém ela foi agrupada junto com as cepas da cadeia produtiva.

Figura 5. Representação da correlação entre os três perfis RAPD obtidos com os "primers" OPB17 e 23L para 108 cepas de *S. Enteritidis* (RAPD1, RAPD2 e RAPD3) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, *S. Senftenberg* (SS), *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e *E. coli* ATCC25922 (EC).

O RAPD é um método pouco trabalhoso, de execução rápida e não apresentou problemas com a reprodutibilidade neste estudo. Porém, o poder discriminatório foi extremamente baixo com os "primers" utilizados. Uma vez que o método é conhecido pelo seu potencial em discriminar cepas proximamente relacionadas, outros "primers" podem ser testados, buscando melhor capacidade de discriminação, sobretudo com relação a cepas não relacionadas. De fato, revisões avaliando os resultados do método recomendam que em cada situação em que se use RAPD sejam selecionados "primers" adequados a partir de testes com o conjunto específico de cepas a ser subtipado e um grande conjunto de "primers" arbitrários (MASLOW et al., 1993; POWER et al., 1996; TENOVER et al., 1997; TYLER et al., 1997).

FADL et al. (1995) usaram RAPD com o "primer" MK22, de 15 nucleotídeos e 47% G+C (TGA GCA TAG ACC TCA), para analisar 33 cepas de *S. Enteritidis* de origem aviária e humana, isoladas nos EUA, obtendo sete perfis RAPD. A seleção do "primer" usado foi feita a partir de quatro "primers" testados (MK21 a MK24), sendo que este foi o que apresentou os melhores resultados. Eles ressaltam que o poder discriminatório obtido foi suficiente para diferenciar cepas de mesmo fagotipo, mesmo empregando apenas um "primer".

HILTON et al. (1996) fizeram uma seleção a partir de conjunto de "primers" de 10 nucleotídeos, escolhendo o "primer" 1254 (5' CCG CAG CCA A 3') para subtipar por RAPD 37 cepas de diversos sorotipos de *Salmonella*, de diversas coleções de culturas na Inglaterra. As oito *S. Enteritidis* isoladas de alimentos incluídas no estudo puderam ser separadas em quatro perfis que também diferenciaram cepas de mesmo fagotipo. Quanto ao grande grupo de cepas eles comentam que o poder discriminatório poderia ser aumentado com o uso de "primers" adicionais, ressaltando a importância da seleção destes, de forma que não diferenciem cepas que são relacionadas e vice-versa.

LIN et al. (1996) testaram 65 "primers" arbitrários frente a um conjunto de quatro cepas de *S. Enteritidis* de fagotipos diferentes. Por terem apresentados bons resultados nos testes, os "primers" 23 L (CCG AAG CTG C), OPB17 (AGG GAA CGA G), OPA4 (AAT CGG GCT G), OPB6 TGC TCT GCC C), P1254 (CCG CAG CCA A) e OPB15 (GGA GGG TGT T) foram selecionados para subtipar 29 isolados de sete fagotipos e previamente caracterizados por ribotipagem (13 perfis) e PFGE (10 perfis). Os resultados combinados dos seis "primers" permitiram separar as cepas em 14 perfis RAPD, sendo que o "primer" OPB17 foi mais eficiente em diferenciar cepas de um mesmo fagotipo.

MILLEMANN et al. (1996) analisaram 14 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de três espécies de aves criadas em quatro aviários diferentes. De 40 "primers" testados, usaram dois (OPG08 [TCA CGT CCA C] e OPH13 [GAC GCC ACA C]) para subtipar as 14 cepas de *S. Enteritidis*, obtendo três perfis RAPD. Os pesquisadores apontam que o RAPD produziu melhores resultados para o sorotipo *Enteritidis* que ERIC-PCR e ribotipagem, métodos pelos quais as cepas também foram analisadas.

LANDERAS & MENDOZA (1998) usaram os "primers" MK22, OPB6 e OPB17 por seus bons resultados nos estudos anteriormente citados. Eles analisaram, por RAPD, 65 cepas de *S. Enteritidis* associadas com infecções em humanos, sendo 49 cepas de diferentes localidades do Principado de Astúrias e 16 de outras regiões da Espanha. Todas as 65 cepas foram analisadas com o "primer" MK22, apresentando um mesmo perfil. As 31 cepas analisadas também com os outros dois "primers" foram separadas em quatro grupos, porém com poder discriminatório bastante baixo ($D=0,31$).

Em outro trabalho, LANDERAS et al. (1998) obtiveram, em várias regiões da Espanha, entre 1985 e 1996, 90 isolados de *S. Enteritidis*, representando 63 cepas, a partir de carnes, ovos, alimentos contendo ovos e ambiente (água e esgoto). Com o "primer" OPB17 foi possível obter seis perfis, sendo que quatro deles agruparam cepas de alimentos e de água e os outros dois reuniram cepas de referência e/ou clínicas. O perfil mais freqüente reuniu cepas de alimentos crus e cozidos, esgoto, água e ambiente. Este perfil também era idêntico ao perfil mais freqüentemente encontrado em amostras clínicas por LANDERAS & MENDOZA (1998). Os autores usaram, além do RAPD, a ribotipagem para caracterizar geneticamente as cepas e preferiram desconsiderar os resultados do RAPD na avaliação das relações genéticas entre os diferentes grupos genômicos. O motivo seria a dificuldade de

interpretação dos padrões de bandas obtidos com este método, por problemas de reprodutibilidade. Ressaltam ainda que o mesmo problema também representou uma dificuldade no trabalho de LIN et al. (1996) e citam a incapacidade do método em discriminar entre variações artefatuais e polimorfismos verdadeiros, apontada por TYLER et al. (1997).

LING et al. (1998) analisaram em Hong Kong (China) 275 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de amostras clínicas. Usaram um "primer" de 15 nucleotídeos (TGA GCA TAG ACC TCA) e obtiveram seis perfis diferentes. Porém, 95% das cepas foram alocadas em apenas um dos perfis.

LACONCHA et al. (1998) também subtiparam as 39 cepas de *S. Enteritidis* por RAPD, com o "primer" OPS19 (GAG TCA GCA G). O método apresentou poder discriminatório baixo ($D=0,46$). As 24 cepas não relacionadas foram separadas em cinco grupos, mas 75% delas apresentaram o mesmo perfil.

Na Itália, entre 1997 e 1998, DE CESARE et al. (2001) analisaram por RAPD 71 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de granjas avícolas e alimentos à base de carne de frango, usando os "primers" OPB17 e P1254. Eles obtiveram um poder discriminatório considerado razoável ($D=0,664$), porém, dentre 63 isolados de fazendas avícolas, 60,3% pertenceram a um mesmo perfil RAPD, detectado também em amostra de alimento processado. Além disso, 16 dos isolados não puderam ser subtipados com o "primer" OPB17.

MARÉ et al. (2001), na África do Sul, usaram os "primers" OPL02 (TGG GCG TCA A), OPL03 (CCA GCA GCT T) e OPL12 (GGG CGG TAC T) para subtipar 33 *S. Enteritidis* de diversos fagotipos isoladas de humanos, animais, ovos, ração e ambiente. Os isolados puderam ser separados em apenas quatro clusters e um perfil único. Os autores questionam a validade da fagotipagem para uso em estudos

epidemiológicos, pois não encontraram correlação entre os resultados da fagotipagem e do RAPD.

O DNA de cada cepa foi submetido à digestão com a enzima Pst I e eletroforese convencional. Esta enzima foi selecionada por ter apresentado bons resultados em outros estudos com *S. Enteritidis* (LANDERAS et al., 1996; LANDERAS & MENDOZA, 1998) e por que o gene 16S rRNA não apresenta sítio de restrição para ela. A seguir realizou-se o “Southern blot” para transferência do DNA do gel para a membrana de nitrocelulose e, então, procederam-se as etapas de fixação e denaturação do DNA nesta. A hibridização foi realizada com sonda de 1,3kb preparada por PCR e marcada diretamente com marcador não radioativo (peroxidase). A revelação dos perfis foi feita por fotografia em filme após reação de detecção dos fragmentos hibridizados.

Assim, para 85 das 108 cepas de *S. Enteritidis*, foi possível obter 4 perfis (P1 a P4) (figura 6), com cinco (perfis P2 e P4), seis (perfil P1) ou sete (perfil P3) fragmentos, de 8,5kb a 25,3kb. Já com os 23 isolados restantes não foram obtidas bandas, ou foram obtidos padrões de bandas fracos (pouco sinal) ou irreprodutíveis, após até duas repetições, sendo estes isolados considerados não-tipáveis (NT). Foi possível diferenciar as duas cepas de *S. Senftenberg* (SS) e a cepa de *Escherichia coli* ATCC25922 (EC), porém *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) apresentou perfil idêntico ao ribotipo P1.

Considerando os perfis P1 a P4 e o grupo de isolados não tipados (tabela 8) o poder discriminatório (*D*) obtido foi de 0,701.

Figura 6. Ribotipos obtidos com a enzima de restrição Pst I e hibridização com sonda de 1,3kb para 85 cepas de *S. Enteritidis* (P1 a P4) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, *S. Senftenberg* (SS), *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e *E. coli* ATCC25922 (EC); Marcador de peso molecular Lambda/HindIII Ladder DNA Ladder (New England Biolabs).

Para a análise de similaridade entre os ribotipos (figura 7) foi atribuída ausência de bandas em todas as posições possíveis para todos os isolados considerados não tipáveis (NT). Desta forma, estes isolados formaram um grupo separado, juntamente com *E. coli* ATCC25922 (EC), com 0% de similaridade com os outros perfis.

É importante observar também que o perfil P4 apresentou menor correlação com os demais perfis que as cepas de *S. Senftenberg* (SS) (figura 7). Este desvio pode ser decorrente do emprego da Pst I e supõe-se que com a utilização de uma enzima adicional para digestão do DNA isto poderia ser corrigido.

Todos os isolados deveriam ser tipáveis por ribotipagem, pois todas as bactérias devem apresentar múltiplas cópias do gene 16S rRNA e o uso de enzima

de alta frequência de corte deveria prover suficiente fragmentação do DNA, de forma a separar essas cópias do gene.

Tabela 8. Distribuição das 108 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os ribotipos e grupo não tipável obtidos com a enzima de restrição Pst I e hibridização com sonda de 1,3kb.

Ribotipo	Cepas ^a	Nº de cepas
P1	2 3 5 6 7 17 31 35 36 38 39 40 42 43 44 45 46 56 78 83 89 92 105 106 107	25
P2	1 4 8 9 12 19 23 25 26 27 32 49 50 53 54 57 58 60 61 62 63 64 65 66 67 69 70 71 72 74 75 76 77 79 82 84 86 88 90 91 96 97 98 100 102 103 104 108	48
P3	14 37	2
P4	10 13 15 20 22 28 29 30 51 59	10
NT ^b	11 16 18 21 24 33 34 41 47 48 52 55 68 73 80 81 85 87 93 94 95 99 101	23

^a Consultar tabela 2 para identificação da origem das cepas

^b NT = cepas que apresentaram bandas muito fracas, ou não apresentaram banda, após pelo menos uma repetição da extração de DNA e da digestão/hibridização/detecção.

Para tentar entender o que poderia estar causando este problema as etapas de extração de DNA e de digestão e detecção foram repetidas para alguns dos isolados não tipáveis, sendo que o problema se repetiu em todas as tentativas. Como em um mesmo gel havia perfis com bandas e sem bandas, a hipótese de que o problema fosse relacionado a etapas posteriores à digestão (desde a eletroforese até a detecção) se mostra pouco provável. Pode-se supor que tenham ocorrido problemas na digestão do DNA dessas amostras, pois esta é realizada individualmente, em tubos separados para cada amostra.

Outra possibilidade a ser levantada é a destes isolados terem DNA sensível que estaria se degradando durante as etapas posteriores à digestão. Neste caso, o

problema também deveria ser observado na tipagem por PFGE, quando o DNA digerido é submetido a uma eletroforese demorada, o que não ocorreu. Entretanto deve-se considerar a eletroforese do PFGE é feita a 14°C, enquanto etapas pós-digestão na ribotipagem utilizam temperaturas mais elevadas - como a de fixação do DNA na membrana (80°C/2h), a hibridização (42°C/"overnight") e a lavagem da membrana após hibridização (55°C/20min) - que poderiam contribuir para algum tipo de degradação do DNA destes isolados.

Figura 7. Representação da correlação entre os 4 ribotipos e grupo não tipável obtidos com a enzima de restrição Pst I e hibridização com sonda de 1,3kb para 108 cepas de *S. Enteritidis* (P1 a P4, NT) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, *S. Senftenberg* (SS), *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e *E. coli* ATCC25922 (EC).

Outros autores também têm apontado problemas na etapa de digestão. USERA et al. (1994) subtiparam 30 cepas de *S. Enteritidis* do fagotipo PT8, isoladas de amostras clínicas e de alimentos ligados a surtos nos EUA e na Suíça e de humanos, animais, e alimentos não envolvidas em surtos. Estes pesquisadores encontraram perfis de digestão inconsistentes, ausência de digestão ou incapacidade de diferenciar cepas não relacionadas, empregando as enzimas Cla I, Eco RV, Pvu II, Sph I e Stu I. Os resultados obtidos com as enzimas Acc I e Sma I foram combinados permitindo separar os isolados em sete perfis diferentes. Porém, a maior parte (76,7%) das cepas pertenceu a um mesmo perfil.

NUNES (1999) utilizou a ribotipagem com a enzima Sma I e sonda baseada no gene 16S rRNA contido no plasmídeo pKK3535 de *E. coli* (BROSIUS et al., 1979) para subtipar 250 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de diversas origens, encontrando 11 ribotipos. O autor empregou também a enzima Sph I, tendo observado cepas cujo DNA não foi digerido com esta enzima ou apresentaram digestão incompleta do DNA.

Em vários estudos de revisão (MASLOW et al., 1993; STRUELENS et al., 1996; TENOVER et al., 1997; OLIVE & BEAN, 1999) o poder discriminatório baixo é apontado como uma limitação da ribotipagem, quando empregada na subtipagem de cepas proximamente relacionadas. Porém, apesar de ser um método extremamente trabalhoso e de ter apresentado problemas de tipabilidade com a enzima Pst I, o poder discriminatório obtido no presente trabalho foi bom e provavelmente poderia ser aumentado com o uso de enzimas adicionais. Isto poderia, inclusive, diminuir a correlação verificada entre as cepas de *S. Senftenberg* e os grupos de *S. Enteritidis* encontrados.

OLSEN et al. (1994) na Dinamarca obtiveram oito perfis diferentes com a enzima Sma I ao ribotipar 62 cepas de *S. Enteritidis* de vários fagotipos isoladas a

partir de amostras clínicas e de frango. A ribotipagem permitiu separar cepas de mesmo fagotipo, apesar de alguns ribotipos também terem agrupado cepas de fagotipos diferentes.

A enzima Sph I, que apresentou problemas nos trabalhos de USERA et al. (1994) e NUNES (1999), foi usada com sucesso por outros pesquisadores, em combinação com a enzima Pst I, para subtipar *S. Enteritidis*. LANDERAS et al. (1996) na Espanha selecionaram essas duas enzimas, a partir de um painel com sete, por terem gerado o maior número de ribotipos em um estudo com 115 cepas isoladas de amostras clínicas e de alimentos e água, relacionadas a casos e surtos ocorridos entre 1984 e 1994. Com a combinação dos resultados obtidos com as duas enzimas foram formados 18 grupos e o poder discriminatório obtido foi $D=0,77$.

Em outro estudo (LANDERAS et al., 1998), usaram as mesmas enzimas para subtipar 65 cepas associadas a infecções humanas e 11 cepas de referência, também isoladas na Espanha, obtendo 22 ribotipos e poder discriminatório $D=0,74$.

A enzima Sph I também apresentou bons resultados em um teste realizado na Suíça com 14 enzimas e cinco cepas de *S. Enteritidis* de origem clínica, tendo sido selecionada juntamente com a Sma I para subtipar um total de 47 cepas deste sorotipo (MARTINETTI & ALTWEGG, 1990).

PIGNATO et al. (1996) usaram apenas a enzima Hinc II para subtipar 150 cepas de *S. Enteritidis* isoladas no sul da Itália, de humanos, frango e outros animais, ovos e alimentos contendo ovos, em dois períodos diferentes. Apesar de terem obtido oito ribotipos, 93% das cepas pertenceram a apenas um deles.

Como neste trabalho não foi possível obter padrões de bandas para alguns isolados com a ribotipagem, utilizou-se a PCR-ribotipagem (KOSTMAN et al., 1992)

como método alternativo, tentando buscar diferenciação adicional destes isolados, ao mesmo tempo em que se conserva a semelhança em relação ao polimorfismo pesquisado (rRNA). A facilidade de execução apresentada pelo PCR também foi considerada na seleção deste método. Porém, apenas um mesmo perfil (C1) foi obtido para todos os 108 isolados de *S. Enteritidis* (figura 8). Este perfil apresentou cinco fragmentos, de 741pb a 1485pb. *S. Enteritidis* ATCC13076 também apresentou o perfil C1, mas as duas cepas de *S. Senftenberg* (SS) e a cepa de *Escherichia coli* ATCC25922 (EC) apresentaram perfis diferentes. O poder discriminatório obtido com este método foi nulo ($D=0,000$) para *S. Enteritidis*.

Figura 8. PCR-ribotipos obtidos para 108 cepas de *S. Enteritidis* (C1) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, *S. Senftenberg* (SS), *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e *E. coli* ATCC25922 (EC); CN = controle negativo (água deionizada estéril), PM = marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (New England Biolabs).

O método é rápido, de execução muito simples e identificou sorotipos diferentes de salmonela, porém não permitiu diferenciar cepas do sorotipo Enteritidis

não relacionadas entre si. Dessa forma, se mostrou ineficiente para a subtipagem das cepas estudadas.

A PCR-ribotipagem tem apresentado resultados variáveis quando empregada na subtipagem de *S. Enteritidis*. Apesar de alguns pesquisadores terem conseguido diferenciar cepas deste sorotipo, em outros trabalhos também foi encontrado um mesmo perfil para todas as cepas analisadas ou houve pouca diferenciação entre elas.

JENSEN & HUBNER (1996) utilizaram PCR-ribotipagem para diferenciar 69 cepas de *S. Enteritidis*, com sucesso. As cepas haviam sido previamente caracterizadas por ribotipagem com a enzima *EcoRI*, tendo apresentado quatro ribotipos. A PCR-ribotipagem permitiu dividir as cepas em apenas dois grupos, mas um dos ribotipos apresentou cepas de dois deles. Dessa forma, o poder discriminatório foi aumentado pela combinação dos resultados dos dois métodos.

NASTASI et al. (1997) analisaram na Itália, por PCR-ribotipagem, 243 cepas de *S. Enteritidis* de diversos fagotipos isoladas de material clínico e alimentos e relacionadas a 58 surtos ocorridos entre 1980 e 1994. Eles detectaram nove PCR-ribotipos que agruparam cepas de forma consistente com relação aos dados epidemiológicos disponíveis.

CHMIELEWSKI et al. (2002) analisaram na Polônia 31 cepas de *S. Enteritidis* isoladas de aves de diferentes granjas. A PCR-ribotipagem permitiu diferenciar 14 perfis, separados em dois grupos proximamente relacionados.

Por outro lado, LAGATOLLA et al. (1996), LANDERAS & MENDOZA (1998) e BAUDART et al. (2000) analisaram, por PCR-ribotipagem, 41, 65 e sete cepas, respectivamente, de *S. Enteritidis* de origens diversas ou representantes de diferentes ribotipos e/ou fagotipos, sem obterem diferenciação das mesmas.

Os perfis obtidos com os métodos de PFGE, RAPD, ribotipagem e PCR-ribotipagem foram analisados em conjunto para determinar os subtipos genéticos (genótipos) das cepas (tabela 9). Dessa forma foi possível dividir as cepas em 13 genótipos (G1 a G13) e a correlação entre esses perfis variou entre 89,9% e 99,0% (figura 9).

A combinação dos resultados dos métodos genéticos permitiu a diferenciação da cepa de *S. Enteritidis* ATCC13076 das demais cepas de mesmo sorotipo. Porém, a correlação desta cepa foi maior com algumas cepas da cadeia produtiva estudada que a apresentada por algumas destas cepas entre si. As cepas de *S. Senftenberg* e *E. coli* ATCC25922 foram diferenciadas por todos os métodos e apresentaram correlação baixa com as cepas de *S. Enteritidis*.

O poder discriminatório (*D*) obtido combinando-se todos os métodos genéticos foi igual a 0,804, valor maior que o obtido com cada método isoladamente, porém ainda abaixo do que se poderia considerar ideal (acima de 0,90) (HUNTER & GASTON, 1988). A origem altamente clonal das cepas pode ser apontada como o principal fator a influenciar no poder discriminatório relativamente baixo obtido com os métodos genéticos neste estudo.

Grande parte das cepas (53,7%) pertenceu a apenas dois genótipos - G1 e G2 - que possuem elevada similaridade (99,0%). Estes dois perfis, juntamente com o genótipo G9, reuniram 69,4% das cepas. É importante observar que mesmo quando os métodos empregados possibilitaram a diferenciação entre as cepas, a correlação entre os perfis obtidos permaneceu bastante alta ($\geq 89,9\%$).

Na tabela 10 é apresentada a distribuição dos diferentes genótipos combinados ao longo da cadeia produtiva. Ao avaliar esta tabela é necessário sempre lembrar que a correlação entre os genótipos é elevada.

Tabela 9. Distribuição das 108 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme os 13 genótipos obtidos usando PFGE, RAPD, ribotipagem e PCR-ribotipagem.

Genótipo	Perfil PFGE ^a	Perfil RAPD ^b	Ribotipo ^c	PCR-ribotipo ^d	Cepas ^e	Nº de cepas
G1	PFGE1	RAPD1	P1	C1	2 3 6 7 35 36 39 40 42 43 44 45 46 56 78 92 105 106 107	19
G2	PFGE1	RAPD1	P2	C1	9 12 19 32 49 50 53 54 57 58 60 61 62 63 64 65 66 67 69 70 71 72 74 75 76 77 79 82 86 88 90 91 97 98 100 102 103 104 108	39
G3	PFGE1	RAPD2	P1	C1	17 31 38 83	4
G4	PFGE1	RAPD2	P2	C1	1 4 8 23 25 26 27	7
G5	PFGE1	RAPD2	P3	C1	14 37	2
G6	PFGE2	RAPD1	P1	C1	89	1
G7	PFGE2	RAPD1	P2	C1	84	1
G8	PFGE1	RAPD3	P2	C1	96	1
G9	PFGE1	RAPD1	NT	C1	16 33 34 41 47 52 55 68 73 80 81 87 93 94 95 99 101	17
G10	PFGE2	RAPD1	NT	C1	85	1
G11	PFGE3	RAPD1	P1	C1	5	1
G12	PFGE3	RAPD1	P4	C1	10 13 15 20 22 28 29 30 51 59	10
G13	PFGE3	RAPD1	NT	C1	11 18 21 24 48	5

^a Consultar tabela 6 para identificação dos perfis PFGE

^b Consultar tabela 7 para identificação dos perfis RAPD

^c Consultar tabela 8 para identificação dos ribotipos

^d Consultar figura 8 para identificação do PCR-ribotipo

^e Consultar tabela 2 para identificação da origem das cepas

Como pode ser observado na tabela 10, sete dos 13 genótipos (G1, G2, G4, G9, G11, G12 e G13) foram encontrados em amostras relativas à primeira etapa da cadeia produtiva (P1 a P4), referente à contaminação das aves e ao transporte. Três destes genótipos foram encontrados também nas etapas finais, de embalagem ou armazenamento. A maior parte dos genótipos (G6, G7, G8 e G10) encontrados nas etapas subseqüentes (P5 a P11) é relativa a perfis únicos, com apenas uma cepa cada, e os restantes agrupam poucas cepas (genótipos G3 e G5), apresentando pouca utilidade para o rastreamento de pontos de contaminação.

Figura 9. Representação da correlação genética entre os 13 genótipos obtidos usando PFGE, RAPD, ribotipagem e PCR-ribotipagem para 108 cepas de *S. Enteritidis* (G1 a G13) isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, *S. Senftenberg* (SS), *S. Enteritidis* ATCC13076 (SE) e *E. coli* ATCC25922 (EC) e respectivas representações dos padrões de bandas (verde = PFGE; roxo = RAPD; azul = ribotipagem; rosa = PCR-ribotipagem).

Cepas com genótipo G2 (tabela 9) foram as mais frequentemente encontradas, tendo sido isoladas a partir de amostras relativas a todas as sub-regiões e a todas as etapas da cadeia produtiva (tabela 10).

Entre as 10 cepas com genótipo G12 (tabela 9), sete (70%) foram isoladas de amostras da sub-região R2 (tabela 10), de onde foram isoladas também quatro (80%) das cinco cepas do genótipo G13.

Cepas dos genótipos G1, G4 e G9 não foram encontradas em algumas das sub-regiões, porém não apresentaram correlação específica com nenhuma daquelas de onde foram isoladas, não tendo sido isoladas em maior número de nenhuma delas. Da mesma forma, o genótipo G11 corresponde a um perfil único, sem utilidade para rastreamento de pontos de contaminação.

Tabela 10. Distribuição dos 13 genótipos de *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme ponto de coleta (P1 a P11) e região do integrado (R1 a R7).

Ponto de coleta ^a	Região do integrado ^b							Nº de cepas
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	
P1	-	-	G2	G13	G9	G1	G2	5
P2	G1 (2) G4	G13	G9	G2 (2) G12	-	-	G1 G9	10
P3	G1 G4 G11	G2 G12	G1 G9	G2 (2) G9	G2 (2)	-	-	12
P4	G1	-	G1	G1 G2 (2) G12	-	-	G9	8
P5	-	G5 G12	-	-	-	-	G9	3
P6	-	G3 G9 G13	G3 G5	G2 (2)	-	G2 G9	G2 (2) G8	12
P7	G4	G2 G12 (2) G13	G1 (2)	G2 (2)	G2 (2)	G2 G3 G9	G2 G9(2)	17
P8	-	G4 G13	G9	-	G9	-	G2	5
P9	G2 G12	G4 (3) G12 (2)	G1 (3)	G2 (4)	G2 (3)	G2 G7 G10	G2 (2)	22
P10	-	G12	-	-	-	G9	-	2
P11	-	G3	G1 (2) G9	-	G2	G2 (2) G6	G1 (3) G2	12
Nº de cepas	10	21	16	20	10	13	18	108

^a Consultar figura 1 para localização dos pontos de coleta

^b Consultar tabela 9 para identificação dos genótipos; números entre parênteses indicam a quantidade de cepas de um mesmo genótipo no ponto, quando mais que uma

Do ponto de vista genético o conjunto de cepas avaliado neste estudo se apresenta bastante homogêneo, com pequena variabilidade e, provavelmente, com uma única origem ancestral comum, relativamente recente. A pouca variação no genoma pode indicar adaptação do microrganismo à cadeia produtiva estudada e

também existe a probabilidade de que ocorram contaminações cruzadas no ambiente de criação.

As aves excretam *Salmonella* no ambiente de criação e a partir daí poderia haver contaminação, por exemplo, de roedores que entram nos galpões em busca de alimento. Estes roedores podem disseminar o microrganismo para vários outros locais do ambiente de criação e locais próximos. Destes novos locais pode haver recontaminação dos roedores e reintrodução de *Salmonella* nos galpões, por exemplo, através de fezes deles depositadas sobre a ração das aves, fechando um ciclo de recontaminação e a manutenção de cepas com perfis semelhantes.

Além dos valores de poder discriminatório (D) terem sido determinados para cada método individualmente, também foram calculados para diferentes combinações de métodos, a fim de se avaliar qual combinação poderia permitir uma melhor diferenciação entre os isolados.

A combinação dos resultados de PFGE e RAPD permitiu separar os 108 isolados em cinco grupos, com D igual a 0,485. A ribotipagem combinada com o RAPD gerou oito grupos e apresentou o melhor poder discriminatório obtido com apenas dois métodos ($D = 0,772$). Quando se combinou os resultados de PFGE e ribotipagem, foram obtidos 10 grupos, mas o poder discriminatório foi de 0,736. A obtenção de um maior número de grupos não corresponde necessariamente a um maior poder discriminatório, pois para o cálculo deste índice também é considerada a frequência relativa de cepas em cada grupo (HUNTER & GASTON, 1988).

Deve-se ressaltar que a PCR-ribotipagem não diferenciou as cepas do sorotipo Enteritidis, portanto não interfere no poder discriminatório obtido com os outros três métodos, quando se combina seus resultados.

A ribotipagem foi o método que mais contribuiu para a diferenciação entre os isolados, apresentando o melhor poder discriminatório dentre os métodos genotípicos, porém mostrou-se extremamente trabalhosa e demorada.

Melhores resultados na ribotipagem poderiam ser obtidos a partir de testes com várias enzimas e um pequeno número de cepas, a partir dos quais se poderiam selecionar as que apresentassem melhor poder discriminatório para uso na tipagem de todas as cepas. A pesquisa de um maior número de polimorfismos é outra forma de melhorar o poder discriminatório, podendo ser obtido com o uso de mais de uma enzima. Porém, em ambos os casos, há que se considerar a demanda de trabalho, gasto de reagentes e o tempo despendido nas diversas etapas da tipagem. Um sistema de ribotipagem automatizada tem apresentado bons resultados na diferenciação de *S. Enteritidis* (HILTON & PENN, 1998; DE CESARE et al., 2001) e poderia ser apontado como alternativa para facilitar o trabalho. Porém, estes sistemas envolvem equipamentos caros, disponíveis apenas em poucos laboratórios onde a demanda do uso justifica sua aquisição e manutenção.

O RAPD é conhecido por apresentar boa capacidade em discriminar cepas proximamente relacionadas. Neste estudo permitiu a diferenciação de cepas do sorotipo Enteritidis, porém apresentou baixo poder discriminatório. Mesmo assim, melhorou levemente o poder discriminatório da ribotipagem. Uma seleção prévia de "primers" com melhor poder discriminatório possibilitaria a obtenção de resultados mais conclusivos que os obtidos aqui.

Já a análise por PFGE poderia ser indicada como um terceiro método a ser empregado quando é necessário diferenciar cepas de *S. Enteritidis* que não puderam ser diferenciadas por ribotipagem ou RAPD. Apesar de ter apresentado baixo poder discriminatório isoladamente, neste trabalho o método permitiu subdividir cepas de mesmo ribotipo e com mesmo perfil RAPD (tabela 9).

A correlação entre os resultados dos métodos genéticos e as características fenotípicas das cepas é apresentada na tabela 11.

Neste estudo não foi verificada correlação entre os fagotipos e a origem genética das cepas. A fagotipagem foi capaz de diferenciar cepas de mesmo genótipo e os métodos genéticos também permitiram a diferenciação de cepas de mesmo fagotipo.

A fagotipagem permitiu separar as cepas de cada um dos genótipos G1, G2, G3, G9, G12 e G13 em dois ou três grupos. O genótipo G4, com sete cepas, foi o único a não ser subdividido pela fagotipagem, além, obviamente, dos genótipos G6, G7, G8, G10 e G11, que correspondem a perfis únicos. Uma das duas cepas de genótipo G5 não foi fagotipada.

O fagotipo PT4, com maior número de cepas (n=74), foi também o que apresentou maior diversidade genética (12 genótipos), sendo que apenas o genótipo G11 não foi identificado em cepas deste fagotipo. As 19 cepas do fagotipo PT1 se dividiram entre os genótipos G1, G2, G3, G9, G11 e G12 e as 14 do fagotipo PT7a puderam ser separadas em quatro genótipos (G2, G9, G12 e G13).

Todos os genótipos incluíram cepas com resistência e/ou resistência intermediária a enrofloxacina e/ou furazolidona. Dessa forma, fica evidente que a resistência está sendo adquirida ou perdida independente de ser detectada pelos métodos genéticos empregados. Isto pode indicar que a pressão seletiva estaria sendo exercida em algum ponto após a mutação que gerou os polimorfismos, ou seja, inclusive sobre cepas que já estariam adaptadas ao ambiente.

Tabela 11. Distribuição da resistência a antimicrobianos e fagotipo de 108 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola, conforme o genótipo.

Genótipo ^a	Fagotipo ^b	Nº de cepas ^c									
		Total	Multi-sensíveis	Resistentes e com resistência intermediária a							
				Enr	Fr	Fox	Cip	Amp	Te	Ctx	C
G1	PT1	8	1	3(4)	3(3)	(1)	-	1	-	-	-
G1	PT4	11	-	3(8)	2(7)	-	-	-	-	-	-
G2	PT1	4	-	(4)	(1)	-	-	-	-	-	-
G2	PT4	30	3	3(22)	2(19)	(1)	1(1)	-	(1)	-	-
G2	PT7a	5	1	(4)	(2)	-	-	-	-	-	-
G3	PT1	2	-	(2)	(1)	-	-	-	-	-	-
G3	PT4	2	-	1(1)	(1)	-	-	-	-	-	-
G4	PT4	7	-	4(3)	2(1)	(1)	(2)	-	(1)	-	-
G5	PT4	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-
G5	ND	1	-	(1)	(1)	-	-	-	-	-	-
G6	PT4	1	-	(1)	(1)	-	-	-	-	-	-
G7	PT4	1	-	(1)	(1)	-	-	-	-	-	-
G8	PT4	1	-	(1)	-	-	-	-	-	-	-
G9	PT1	1	-	1	(1)	-	(1)	-	-	-	-
G9	PT4	14	-	3(10)	2(9)	2(1)	-	-	(1)	(1)	-
G9	PT7a	2	-	1(1)	1(1)	-	(1)	(1)	-	-	(1)
G10	PT4	1	-	(1)	(1)	-	-	-	-	-	-
G11	PT1	1	-	(1)	-	-	-	-	-	-	-
G12	PT1	3	1	-	1(1)	-	-	-	-	-	-
G12	PT4	3	1	-	1(1)	-	-	-	-	-	-
G12	PT7a	4	-	-	2(2)	-	-	-	-	-	-
G13	PT4	2	-	-	1(1)	-	-	-	-	-	-
G13	PT7a	3	-	-	1(2)	-	-	-	-	-	-

^a Consultar tabela 9 para identificação dos genótipos; linhas pontilhadas separam os genótipos

^b Consultar tabela 3 para identificação dos fagotipos; ND = o fagotipo desta cepa não foi determinado

^c Amp = ampicilina (10µg); C = cloranfenicol (30µg); Cip = ciprofloxacina (5µg); Ctx = cefotaxima (30µg); Enr = enrofloxacin (5µg); Fox = ceftiofina (30µg); Fr = furazolidona (15µg); Te = tetraciclina (30µg); multi-sensíveis = sensíveis a todos os antimicrobianos acima, além de amicacina (30µg), ceftazidima (30µg), imipenem (10µg), sulfametoxazol+trimetoprima (25µg) e tetraciclina (30µg); vermelho = somente cepa resistente; laranja = cepas resistentes e cepas com resistência intermediária (entre parênteses); amarelo = cepas com resistência intermediária (entre parênteses)

Nos genótipos G3, G5 a G8 e G10 a G13 há somente cepas resistentes ou com resistência intermediária exclusivamente a enrofloxacin e/ou furazolidona. Os genótipos com maior número de cepas (G1, G2 e G9) e o genótipo G4 apresentaram maior variação com relação à sensibilidade a antimicrobianos, incluindo cepas com resistência ou resistência intermediária a outras das drogas testadas.

A maioria (93,3%) das cepas dos genótipos G12 e G13 apresentou resistência intermediária ou foi resistente exclusivamente à furazolidona. As outras duas cepas destes genótipos (cepas nºs 10 e 22) eram multi-sensíveis. Conforme apresentado anteriormente, as cepas pertencentes aos genótipos G12 e G13 estavam mais associadas a amostras da sub-região R2. Assim, pode-se supor que as cepas desta região tenham uma origem comum e diferente da maior parte das outras encontradas neste estudo.

Finalmente, considerando os dados apresentados, podem-se analisar de forma global os dados obtidos nesta pesquisa.

A fagotipagem foi empregada neste trabalho por ser um método clássico de subtipagem de cepas do sorotipo Enteritidis, sendo considerado um marcador epidemiológico muito importante. Porém, as cepas analisadas pertenciam a poucos fagotipos, que não puderam ser correlacionados com os perfis genéticos.

A resistência intermediária a ciprofloxacina detectada em cepas isoladas de produto alimentício é fato extremamente importante e muito preocupante do ponto de vista da saúde pública. O grande número de cepas com resistência intermediária ou resistentes à furazolidona não é facilmente explicado e deve ser alvo de estudos futuros. De qualquer forma é importante ressaltar que a diminuição da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos em criação animal, continua sendo uma recomendação importante apontada em trabalhos como os de SILVA &

DUARTE (2002) e GUERRA et al. (2003). Neste sentido podem ser utilizados métodos como o HACCP (análise de perigos e pontos críticos de controle), vacinação, emprego de pre- e probióticos, exclusão competitiva e outras formas de controle de patógenos.

Os métodos genéticos empregados produziram resultados variados quanto ao poder discriminatório, com alguns deles apresentando melhor capacidade de diferenciar as cepas. Quando seus resultados foram analisados em conjunto permitiram diferenciação adicional e aumento de poder discriminatório. A ribotipagem combinada ao RAPD se mostrou eficiente para a diferenciação de *S. Enteritidis* e esta combinação poderia ser recomendada para uso em estudos similares. Porém, outros "primers" ou enzimas poderiam ser empregados, de forma a otimizar os resultados.

Foi verificada elevada similaridade genética entre os genótipos identificados, mas alguns deles agruparam um número maior de cepas. Isto pode indicar que há uma origem genética comum a todas as cepas. Por outro lado, a diversidade observada, quando correlacionada com sua distribuição, permite supor que algumas cepas estão adaptadas à cadeia produtiva estudada e podem não ter chegado a ela por transmissão vertical entre as aves.

Apesar de não ter sido possível identificar etapas do processamento especialmente importantes na contaminação do produto final, foi observada correlação entre cepas de determinados genótipos e resistência à furazolidona em amostras relativas a uma sub-região. Assim, pode-se supor haver pelo menos um subgrupo de cepas com características feno- e genotípicas diferentes das demais e associadas especialmente às amostras relacionadas a um dos produtores avícolas.

5. CONCLUSÕES

- As cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas neste estudo apresentaram elevada similaridade entre si, sendo que a maior parte dos genótipos encontrados foram detectados em várias sub-regiões, sem correlação acentuada com nenhuma delas. Apenas dois genótipos foram isolados com maior frequência a partir de amostras de uma das sub-regiões e apresentaram resistência intermediária ou foram resistentes a furazolidona.

- O elevado número de cepas com resistência, ou resistência intermediária, a enrofloxacina e furazolidona distribuídas por toda a cadeia produtiva pode indicar a presença de pressão seletiva atuante. O isolamento de cepa com resistência intermediária a ciprofloxacina é motivo de preocupação em relação à saúde pública, por ser esta a droga de primeira escolha no tratamento clínico de diarreia causada por salmonelas não-tifóides em humanos.

- A ribotipagem foi o método que apresentou o melhor poder discriminatório entre os métodos empregados neste estudo. O seu uso combinado com o RAPD aumentou o poder discriminatório da ribotipagem e a análise por PFGE permitiu diferenciar cepas de mesmo ribotipo e perfil RAPD. A PCR-ribotipagem não foi capaz de diferenciar cepas do sorotipo Enteritidis.

- A fagotipagem apresentou baixo poder discriminatório e os três fagotipos encontrados estavam disseminados em todas as etapas da cadeia produtiva e em

todas as sub-regiões estudadas. Não foi verificada correlação entre fagotipagem e genótipos, indicando que este método talvez tenha utilidade limitada em estudos epidemiológicos deste tipo. Ainda assim, é um método clássico e gera informações complementares às obtidas com os métodos genéticos.

6. REFERÊNCIAS*

- AARESTRUP, F.M.; WIUFF, C.; MØLBAK, K.; THRELFALL, E.J. Is it time to change fluoroquinolone breakpoints for *Salmonella* spp.? **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v.47, n.2, p.827-829, 2003.
- AHRNÉ, S.; FRANKLIN, A. [Contemporary animal husbandry and food production: changes in the intestinal flora due to modern food preservation procedures]. **Läkartidningen**, v.94, n.40, p.3493-3495, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGO. Relatório anual 2004. 2005. Disponível em: <http://www.abef.com.br/relatorios/rel2004.zip>. Acesso em: 20 jun. 2005.
- BAUDART, J.; LEMARCHAND, K.; BRISABOIS, A.; LEBARON, P. Diversity of *Salmonella* strains isolated from the aquatic environment as determined by serotyping and amplification of the ribosomal DNA spacer regions. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n.4, p.1544-1552, 2000.
- BAUER, A.W.; KIRBY, M.M.W.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v.45, p.493-496, 1966.
- BELI, E.; DURAKU, E.; TELO, A. *Salmonella* serotypes isolated from chicken meat in Albania. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.71, n.2/3, p.263-266, 2001.
- BOONMAR, S.; BANGTRAKULNONT, A.; PORNRUNANGWONG, S.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H.; KANEKO, K.-I.; OGAWA, M. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.4, p.971-974, 1998.

De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SisLegis - Sistema de Consulta a Legislação. **Instrução Normativa n.9, de 27 de junho de 2003.** Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1398>. Acesso em: 20 dez. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Legislação. SisLegis - Sistema de Consulta a Legislação. **Portaria n.193, de 12 de maio de 1998.** Aprova o Regulamento Técnico para o licenciamento e a renovação de licença de antimicrobianos de uso veterinário, anexo, elaborado pela Secretaria de Defesa Agropecuária. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1125>. Acesso em: 20 dez. 2005.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Produção brasileira de carne de frango. Estatísticas. Pecuária. **Brasil: produção de carne de frango.** 2005. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/PECUARIA/3.2.XLS>. Acesso em: 20 jun. 2005.

BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* nomenclature. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.7, p.2465-2467, 2000.

BROSIUS, J.; PALMER, M.L.; KENNEDY, P.J.; NOLLER, H.F. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.75, n.10, p.4801-4805, 1979.

BRYAN, F.L.; DOYLE, M.P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **J. Food Prot.**, Dês Moines, v.58, n.3, p.326-344, 1995.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of *Escherichia coli* O157:H7 by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). In: _____. **PulseNet:** The national molecular subtyping network for foodborne disease surveillance. Atlanta: Centers for Disease Control, 2000. Section 5.11, p.1-14.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Preliminary FoodNet data on the incidence of foodborne illness - selected sites, United States, 2001. **MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.**, Atlanta, v.51, n.15, p.325-329, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5115a3.htm>. Acesso em: 17 mar. 2002.

CHMIELEWSKI, R.; WIELICZKO, A.; KUCZKOWSKI, M.; MAZURKIEWICZ, M.; UGORSKI, M. Comparison of ITS profiling, REP- and ERIC-PCR of *Salmonella* enteritidis isolates from Poland. **J. Vet. Med., Ser. B**, Berlin, v.49, n.4, p.163-168, 2002.

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

D'AOUST, J.-Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.13, p.207-216, 1991.

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

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

- DILLON, J.-A.R.; BEZANSON, G.S.; YEUNG, K.-H. Basic techniques. In: DILLON, J.-A.R.; NASIM, A.; NESTMANN, E.R., eds. **Recombinant DNA methodology**. New York, Chichester: John Wiley, 1985. p.13-30.
- DODD, C.E.R. The application of molecular typing techniques to HACCP. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.5, p.160-164, 1994.
- FADL, A.A.; NGUYEN, A.V.; KHAN, M.I. Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by arbitrarily primed PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.4, p.987-989, 1995.
- FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, Dês Moines, v.59, n.10, p.1091-1101, 1996.
- FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; GEREMIAS, A.L.; VAZ, T.M.I. Integração do Instituto Adolfo Lutz na Rede Internacional de Subtipagem Molecular para a Vigilância de Doenças Transmitidas por Alimentos - Rede PulseNet América Latina para caracterização molecular de sorotipos de *Salmonella*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23. Santos, SP, 2005. **CD de resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, s.d. Resumo 1468-1.
- FERRARO, M.J. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twelfth informational supplement**. Wayne: NCCLS, 2002. 136p. (NCCLS document M100-S12, v.22, n.1).
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Risk Assessment of Microbiological Hazards in Foods**. Rome, 2000. Disponível em: [http://www.who.int/fsf/Micro/Report_of%20 July2000 Consultation.pdf](http://www.who.int/fsf/Micro/Report_of%20July2000_Consultation.pdf). Acesso em: 17 mar. 2003.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. WORLD HEALTH ORGANIZATION. CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Joint FAO/WHO Standards Programme Codex Committee on Food Hygiene: thirty-fifth session, orlando, U.S.A., 27 january – 1 february 2003. **Discussion paper on risk management strategies for *Salmonella* spp. in poultry.** 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/codex/ccfh35/fh0305ae.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2002.

FUZHARA, T.O. **Frequência e características de *Salmonella* em abatedouros de pequeno e médio porte da região do grande ABC.** São Paulo, 2001. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, S.A.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **J. Food Prot.**, Dês Moines, v.63, n.12, p.1749-1753, 2000.

GARAZAR, J.; LÓPEZ-MOLINA, N.; LACONCHA, I.; BAGGESEN, D.L.; REMENTERIA, A.; VIVANCO, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.66, n.12, p.5273-5281, 2000.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P.A.D. Ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools. **Ann. Inst. Pasteur/Microbiol.**, Paris, v.136B, p.165-175, 1986.

GUERRA, B.; MALORNY, B.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R. Multiple resistance mechanisms in fluoroquinolone-resistant *Salmonella* isolates from Germany. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, n.6, p.2059, 2003.

HAKANEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P.; HELENIUS, H.; SIITONEN, A. Reduced fluoroquinolone susceptibility in *Salmonella enterica* serotypes in travelers returning from Southeast Asia. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.7, n.6, p.996-1003, 2001.

- HENSON, S. Estimating the incidence of food-borne *Salmonella* and the effectiveness of alternative control measures using the Delphi method. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.35, p.195-204, 1997.
- HILTON, A.C.; BANKS, J.G.; PENN, C.W. Optimization of RAPD for fingerprinting of *Salmonella*. **Lett. Appl. Microbiol.**, v.24, p.243-248, 1997.
- HILTON, A.C.; BANKS, J.G.; PENN, C.W. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. of salmonella strains differentiation and characterization of amplified sequences. **J. Appl. Bacteriol.**, v.81, p.575-584, 1996.
- HILTON, A.C.; PENN, C.W. Comparison of ribotyping and arbitrarily primed PCR for molecular typing of *Salmonella enterica* and relationships between strains on the basis of these molecular markers. **J. Appl. Microbiol.**, v.85, p.933-940, 1998.
- HOFER, E.; DA SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.17, n.2, p.55-62, 1997.
- HOGUE, A. **Risk assessment of microbiological hazards in foods: a global perspective.** Disponível em <http://www.who.int/fsf/Micro/studycourse/allan/index.html>. Acesso em: 17 mar. 2003.
- HUNTER, P.R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, n.9, p.1903-1905, 1990.
- HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, n.11, p.2465-2466, 1988.
- IRINO, K.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. Progression of *Salmonella enteritidis* phage type 4 strains in São Paulo state, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.38, n.3, p.193-196, 1996.

- JENSEN, M.A.; HUBNER, R.J. Use of homoduplex ribosomal DNA spacer amplification products and heteroduplex cross-hybridization products in the identification of *Salmonella* serovars. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.62, n.8, p.2741-2746, 1996.
- JENSEN, M.A.; WEBSTER, J.A.; STRAUS, N. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.4, p.945-952, 1993.
- JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.64, p.367-372, 2001.
- KOSTMAN, J.R.; EDLIND, T.D.; LIPUMA, J.J.; STULL, T.L. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.8, p.2084-2087, 1992.
- LACONCHA, I.; BAGGESEN, D.L.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v.75, p.155-165, 2000.
- LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I.; GARAIZAR, J. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.40, p.27-34, 1998.
- LAGATOLLA, C.; DOLZANI, L.; TONIN, E.; LAVENIA, A.; DI MICHELE, M.; TOMMASINI, T.; MONTI-BRAGADIN, C. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.10, p.2440-2443, 1996.
- LANDERAS, E.; GONZÁLES-HEVIA, M.A.; ALZUGARAY, R.; MENDOZA, M.C. Epidemiological differentiation of pathogenic strains of *Salmonella enteritidis* by ribotyping. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.9, p.2294-2296, 1996.

- LANDERAS, E.; GONZÁLES-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis: relationships between food, water and pathogenic strains. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.43, p.81-90, 1998.
- LANDERAS, E.; MENDOZA, M.C. Evaluation of PCR-based methods and ribotyping performed with a mixture of PstI and SphI to differentiate strains of *Salmonella* serotype Enteritidis. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v.47, n.5, p.427-434, 1998.
- LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; BRESLIN, M.F.; DAVIES, R.H.; WOODWARD, M.J. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.1, p.154-161, 2001.
- LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v.44, p.52-59, 1996.
- LIN, A.W.; USERA, M.A.; BARRET, T.J.; GOLDSBY, R.A. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.4, p.870-876, 1996.
- LING, J.M.; KOO, I.C.; KAM, K.M.; CHENG, A.F. Antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis strains isolated in Hong Kong from 1986 to 1996. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.6, p.1693-1699, 1998.
- LÍRIO, V.S.; SILVA, E.A.; STEFONI, S.; CAMARGO, D.; RECCO, E.A.P.; MALUF, Y.T.; MIYAZAWA, T.T.; NEVES, D.V.D.A.; OLIVEIRA, V.M.R. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v.12, p.36-42, 1998.
- LIU, S.-L.; SANDERSON, K.E. Rearrangements in the genome of the bacterium *Salmonella typhi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Saint Louis, v.92, p.1018-1022, 1995.

- LUKINMAA, S.; SCHILDT, R.; RINTTILÄ, T.; SIITONEN, A. *Salmonella* Enteritidis phage types 1 and 4: pheno- and genotypic epidemiology of recent outbreaks in Finland. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.7, p.2176-2182, 1999.
- MARÉ, L.; DICKS, L.M.T.; VAN-DER-WALT, M.L. Characterization of South African isolates of *Salmonella enteritidis* by phage typing, numerical analysis of RAPD-PCR banding patterns and plasmid profiles. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.64, p.237-245, 2001.
- MARTINETTI, G.; ALTWEGG, M. rRNA gene restriction patterns and plasmid analysis as a tool for typing *Salmonella enteritidis*. **Res. Microbiol.**, Amsterdam, v.141, p.1151-1162, 1990.
- MASLOW, J.N.; MULLIGAN, M.E.; ARBEIT, R.D. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.17, p.153-164, 1993.
- MATSUOKA, D.M.; COSTA, S.F.; MANGINI, C.; ALMEIDA, G.M.D.; BENTO, C.N.; VAN DER HEIJDEN, I.M.; SOARES, R.E.; GOBARA, S.; TÁVORA, L.G.F.; LEVIN, A.S. A nosocomial outbreak of *Salmonella Enteritidis* associated with lyophilized enteral nutrition. **J. Hosp. Infect.**, v.58, p.122-127, 2004.
- MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; McCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.5, n.5, p.607-625, 1999.
- MEUNIER, J.-R.; GRIMONT, P.A.D. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. **Res. Microbiol.**, v.144, p.373-379, 1993.
- MILLEMANN, Y.; LESAGE, M.-C.; CHASLUS-DANCLA, E.; LAFONT, J.-P. Value of plasmid profiling, ribotyping, and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella typhimurium* and *S. enteritidis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.1, p.173-179, 1995.

- MILLEMANN, Y.; LESAGE-DESCAUSES, M.-C.; LAFONT, J.-P.; CHASLUS-DANCLA, E. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.14, n.2/3, p129-134, 1996.
- NASTASI, A.; MAMMINA, C.; CANNOVA, L. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis, Southern Italy, 1990-1998. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.6, n.4, p.401-403, 2000.
- NASTASI, A.; MAMMINA, C.; FANTASIA, M.; PONTELLO, M. Epidemiological analysis of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from foodborne outbreaks occurring in Italy, 1980-1994. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v.46, p377-382, 1997.
- NUNES, I.A. ***Salmonella* Enteritidis – fagotipos, susceptibilidade a drogas antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao rRNA**. São Paulo, 1999. 129p. Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.
- NUNES, I.A.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MEAD, G.C.; SANTOS, M.A.A.; SOLARI, C.A.; SILVA, O.R.; FERREIRA, A.J.P. Phage Typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. **J. Food Prot.**, Dês Moines, v.66, n.2, p.324-327, 2003.
- OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.
- OLIVEIRA, S.D.; FLORES, F.S.; SANTOS, L.R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.97, p.297-305, 2005.

- OLSEN, J.E.; SKOV, M.N.; THRELFALL, E.J.; BROWN, D.J. Clonal lines of *Salmonella* enterica serotype Enteritidis documented by is200-, ribo-, pulsed-field gel electrophoresis and RFLP typing. **J. Med. Microbiol.**, Reading, v.40, p.15-22, 1994.
- OPLUSTIL, C.P.; NUNES, R.; MENDES, C.; RESISTNET GROUP. Multicenter evaluation of resistance Patterns of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Shigella* spp. isolated from clinical specimens in Brazil: RESISTNET Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, Salvador, v.5, n.1, p.8-12, 2001.
- OSCAR, T.P. Identification and characterization of *Salmonella* isolates by automated ribotyping. **J. Food Prot.**, Dês Moines, v.61, n.5, p.519-524, 1998.
- PANALIMENTOS. SIRVETA. Disponível em: http://www.panalimentos.org/sirveta/e/report_eta01.asp. Acesso em: 17 mar. 2003.
- PELKONEN, S.; ROMPPANEM, E.-L.; SIITONEN, A.; PELKONEN, J. Differentiation of *Salmonella* serovars Infantis isolates from human and animal sources by fingerprinting IS200 and 16S *rrn* Loci. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, n.9, p.2128-2133, 1994.
- PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C; LIMA, S.I.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; GELLI, D.S. *Salmonella*: determinação de sorotipos e resistência a agentes antimicrobianos de cepas isoladas de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto - SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, São Paulo, v.58, n.1, p.41-46, 1999.
- PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C; LIMA, S.I.; MARQUES, D.F.; RODRIGUES, E.C.A.; FERNANDES, S.A.; GELLI, D.S.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.32, n.5, p.477-483, 1998.
- PIGNATO, S.; NASTASI, A.; MAMMINA, C.; FANTASIA, M.; GIAMMANCO, G. Phage types and ribotypes of *Salmonella enteritidis* in Southern Italy. **Zentralbl. Bakteri.**, Stuttgart, v.283, n.3, p.399-405, 1996.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. **Res. Microbiol.**, Amsterdam, v.155, n.7, p.568-570, 2004.

POWER, E.G.M. RAPD typing in microbiology - a technical review. **J. Hosp. Infect.**, v.34, p.247-265, 1996.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SYSTEM. **Communicable Disease Report.** Enteric. v.12, n.2, 2002. Disponível em: <http://www.phls.org.uk/publications/cdr/PDFfiles/2002/cdr0202.pdf>. Acesso em: 17 mar. 2003.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SYSTEM. **Communicable Disease Report.** Enteric. v.13, n.2, 2003. Disponível em: <http://www.phls.org.uk/publications/cdr/archive03/News/news0203.htm>. Acesso em: 17 mar. 2003.

RALPH, D.; MCCLELLAND, M. Arbitrarily primed PCR methods for studying bacterial diseases. In: WOODFORD, N.; JOHNSON, A.P. **Molecular bacteriology: protocols and clinical applications**. Totowa: Humana Press, 1998. p.83-102. (Methods in molecular medicine, v.15).

RAMPLING, A. *Salmonella enteritidis* five years on. **Lancet**, v.342, p.317-318, 1993.

REIS E.M.F. 1994. Análise de marcadores epidemiológicos de *Salmonella enteritidis* oriundos de diferentes fontes de infecção e de regiões do país. Tese Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Veterinária, UFRRJ. 69p. *apud* HOFER, E.; DA SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

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

- ROSAS, C.O.; MEDEIROS, V.M.; WARNKEN, M.B. Estudo da resistência antimicrobiana em isolados de *Salmonella* Enteritidis. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 23. Santos, SP, 2005. **CD de resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, s.d. Resumo 993-1.
- SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. *Salmonella* infections. In:_____. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington: ASM Press, 1994. cap.19, p.229-243.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T., eds. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. v.3.
- SANTOS, D.M.S.; BERCHIERI JR.; A. FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesq. Vet. Bras.**, n.20, p.39-42, 2000.
- SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, Cambridge, v.37, p.67-75, 1984.
- SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.**, Campinas, v.4, n.2, p.85-100, 2002.
- SIMPSON, E.H. Measurement of diversity. **Nature**, London, v.163, p.688, 1949.
- SNEATH, P.H.A.; SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: H. W. Freeman, 1973. 573p. (A series of books in biology).
- SOTO, S.M.; GUERRA, B.; GONZÁLES-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.65, n.11, p.4830-4836, 1999.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, Amsterdam, v.98, p.503-517, 1975.

- STRUELENS, M.J.; EUROPEAN STUDY GROUP ON EPIDEMIOLOGICAL MARKERS. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. **Clin. Epidemiol. Infect.**, v.2, p.2-11, 1996.
- SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T.J.; HUNTER, S.B.; TAUXE, R.V.; CDC PULSENET TASK FORCE. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.7, n.3, p.382-389, 2001.
- TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.38, n.2, p.119-127, 1996.
- TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.R.; PERESI, J.T.M.; FUZIHARA, T.O.; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **J. Food Prot.**, Dês Moines, v.65, n.6, p.1041-1044, 2002.
- TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.38, n.5, p.315-322, 1996.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. **Infect. Control Hosp. Infect.**, v.18, n.6, p.426-439, 1997.
- THONG, K.-L.; NGEOW, Y.-F.; ALTWEGG, M.; NAVARATNAM, P.; PANG, T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by pulsed-field gel electrophoresis and ribotyping. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.5, p.1070-1074, 1995.

- THRELFALL, E.J.; CHART, H.; WARD, L.R.; DE SÁ, J.D.; ROWE, B. Interrelationships between strains of *Salmonella enteritidis* belonging to phagetypes 4, 7, 7a, 8, 13, 13a, 23, 24 and 30. **J. Appl. Bacteriol.**, v.75, n.1, p.43-48, 1993.
- TYLER, K.D.; WANG, G.; TYLER, S.D.; JOHNSON, W.M. Factors affecting reliability and reproducibility of amplification-based DNA fingerprinting of representative bacterial pathogens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, p.339-346, 1997.
- USERA, M.A.; POPOVIC, T.; BOPP, C.A.; STROCKBINE, N.A. Molecular subtyping of *Salmonella enteritidis* phage type 8 strains from the United States. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, n.1, p.194-198, 1994.
- UYTTENDAELE, M.R.; DEBEVERE, J.M.; LIPS, R.M.; NEYTS, K.D. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v.40, p.1-8, 1998.
- VARMA, J.K.; GREENE, K.D.; OVITT, J.; BARRET, T.J.; MEDALLA, F.; ANGULO, F.J. Hospitalization and antimicrobial resistance in *Salmonella* outbreaks, 1984-2002. **Emerging Infect. Dis.**, Atlanta, v.11, n.6, p.943-946, 2005.
- VITAL BRAZIL, J. M.; REIS, E.M.F.; COSTA, R.G.; SOLARI, C.A. Sorovares de *Salmonella* em animais e em matérias primas e perfis de resistência aos antimicrobianos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20. **Livro de resumos**. Salvador, 1999. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, s.d. Resumo AL 060, p.359.
- WARD, L.R.; DE SA, J.D.H.; ROWE, B. A phage typing scheme for *Salmonella enteritidis*. **Epidemiol. Infect.**, n.99, p.291-294, 1987.
- WEIDE-BOTJES, M.; KOBE, B.; SCHWARZ, S. Inter- and intra-phage type differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates using molecular typing methods. **Zentralbl. Bakteriol.**, Stuttgart, v.288, p.181-193, 1998.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J.; RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V.
DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers.
Nucleic Acids Res., Oxford, v.18, p.6531-6535, 1990.

ZANCAN, F.T.; BERCHIERI JR., A.; FERNANDES, S.A.; GAMA, N.M.S.Q.
Salmonella spp. Investigation in transport boxes of day-old birds. **Braz. J. Microbiol.**, v.31, p.230-232, 2000.