



## MÉTODOS DE TIPIFICAÇÃO DE *Salmonella* sp.

Natália Menezes Moreira<sup>1</sup>, Julierme José de Oliveira<sup>1</sup>, Fernanda Antunha de Freitas<sup>1</sup>, Aline Pedrosa de Oliveira<sup>2</sup>, Marília Cristina Sola<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mestranda, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

<sup>2</sup>Doutoranda, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

menezes.veterinaria@gmail.com/menezes\_naty@hotmail.com

Recebido em: 06/05/2013 – Aprovado em: 17/06/2013 – Publicado em: 01/07/2013

### RESUMO

*Salmonella* sp. é um dos principais agentes patogênicos responsáveis por toxinfecções, estando associado especialmente a ingestão de alimentos de origem avícola, causando graves implicações em saúde pública. Existem diversos programas de vigilância epidemiológica no Brasil e no mundo com o intuito de promover o monitoramento de cepas responsáveis por infecções em animais e principalmente aquelas envolvidas em casos de surtos alimentares em seres humanos. Desse modo, a tipificação bacteriana se torna uma ferramenta fundamental para a caracterização desses patógenos, sendo possível detectar a relação filogenética entre os isolados bem como o perfil de resistência a antimicrobianos. Assim, com a aplicação de diferentes técnicas é possível aos pesquisadores e agências de saúde pública compreender os fatores epidemiológicos que permeiam a circulação de diversos sorovares de *Salmonella* sp. em uma determinada região.

**PALAVRAS-CHAVE:** genótipo, reprodutibilidade, *Salmonella* sp., tipificação.

### TYPING METHODS OF *Salmonella* sp.

#### ABSTRACT

*Salmonella* sp. is a major pathogen responsible for toxinfecções, especially associated food intake of poultry products, causing serious public health implications. There are several epidemiological surveillance programs in Brazil and in the world in order to promote the monitoring of strains responsible for infections in animals and especially those involved in cases of foodborne outbreaks in humans. Thus, bacterial typing becomes an essential tool for the characterization of these pathogens, and can detect the phylogenetic relationship among the isolates and the antimicrobial resistance profile. Thus, with the application of different techniques is possible for researchers and public health agencies understand the epidemiological factors that permeate the circulation of several serotypes of *Salmonella* sp. in a given region.

**KEYWORDS:** genotype, reproducibility, *Salmonella* sp., typing.

## INTRODUÇÃO

*Salmonella* sp. é um importante micro-organismo patogênico amplamente distribuído pelo mundo e um dos agentes mais comuns responsáveis por gastroenterite em humanos, causando sérias implicações em saúde pública e gastos consideráveis em diversos países. Está frequentemente associado à ingestão de alimentos como ovos, carne de aves e suínos, sendo também isolado de outras fontes como água e vegetais.

Por apresentar uma epidemiologia complexa e difícil controle, diversos programas de monitoramento foram criados com o objetivo de estabelecer vigilância epidemiológica, estudando e acompanhando ao longo do tempo a dinamicidade das cepas de *Salmonella* sp., principalmente as que são envolvidas em surtos alimentares.

Nesse contexto a tipificação de *Salmonella* sp. tornou-se uma importante ferramenta epidemiológica, permitindo a caracterização e a discriminação de cepas pertencentes a mesma espécie, melhorando a compreensão dos pesquisadores sobre a transmissão, patogênese e filogenia dessas bactérias (FOXMAN et al., 2005).

Para tanto, existem diversos métodos baseados em características fenotípicas e genotípicas dos micro-organismos que devem ser escolhidos de acordo com o objetivo do estudo e condições técnicas laboratoriais (FOLEY et al., 2009).

Diante da importância assumida pela tipificação de *Salmonella* sp. dentro do contexto epidemiológico e da diversidade de técnicas existentes, o propósito desta revisão foi relatar os métodos mais utilizados, apresentando seus fundamentos e aplicações no âmbito de pesquisas.

## REVISÃO DE LITERATURA

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, sendo classificado como bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e oxidase negativo (SILVA et al., 2007; CDC, 2011). É dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, com 2.610 sorovares reconhecidos (GUIBOURDENCHE et al., 2010). A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Aproximadamente 99.5% dos sorotipos mais comumente isolados pertencem à subespécie *enterica* (FERREIRA & CAMPOS, 2008).

Como as cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* possuem maior implicância em saúde pública, seu perfil bioquímico é o que normalmente se considera como característico nas análises: fermentação de glicose com produção de ácido e gás, ausência de fermentação de lactose e sacarose, ausência da produção de urease, utilização de citrato, fermentação de dulcitol e ausência de produção de indol (SILVA et al., 2007).

Após a identificação da bactéria utilizando testes bioquímicos e sorológicos, o sorotipo deve ser determinado em laboratórios de referência, baseado em reações antígeno-anticorpo (TOZETTO, 2006).

Dentre os mais de 2500 sorotipos de *Salmonella* conhecidos, aproximadamente 90 são os mais comuns em casos de infecções em animais e seres humanos (BERCHIERI JÚNIOR & FREITAS NETO, 2009).

Programas nacionais e internacionais de vigilância epidemiológica foram criados no intuito de estudar a epidemiologia de *Salmonella* sp. e identificar padrões de resistência a antimicrobianos das cepas ao longo do tempo, contribuindo assim para a identificação de fatores de risco e suas implicações em saúde pública (YAN et al., 2003).

### **Métodos de tipificação**

*Salmonella* sp. é alvo de estudos que enfocam características epidemiológicas e moleculares por se tratar de um importante patógeno responsável por toxinfecções alimentares em humanos apresentando complexa interação entre agente, meio ambiente e diversas espécies de hospedeiros (LIU et al., 2011).

Durante a caracterização epidemiológica de um surto causado por infecção bacteriana é importante estabelecer a relação clonal entre os isolados, pois em vários casos, a origem da doença se encontra na exposição a uma fonte comum do patógeno. Dessa maneira, muitos desses micro-organismos são resultantes da divisão contínua de uma única célula, gerando isolados praticamente idênticos geneticamente (TOZETTO, 2006). Portanto, a identificação e diferenciação de clones bacterianos é possível devido à tipificação bacteriana (OLSEN et al., 1993).

Existem diversas técnicas capazes de diferenciar isolados de *Salmonella* sp. que devem ser constantemente empregadas no âmbito da vigilância epidemiológica, visto o aumento da diversidade de sorovares. Para tanto são aplicados os métodos de tipificação que auxiliam no monitoramento epidemiológico de cepas, sendo possível a investigação da origem de um surto alimentar bem como o monitoramento de perfis de resistência antimicrobiana (YAN et al., 2003). Além disso a tipificação de *Salmonella* também é utilizada para a detecção de focos de contaminação em ambientes de processamento de produtos alimentares (LIM et al., 2005).

Métodos de tipificação bacteriana, portanto, são definidos como qualquer método que possa diferenciar os micro-organismos além da classificação em espécies, apresentando como base a capacidade de comparar isolados e agrupar cepas que demonstrem resultados idênticos (OLSEN et al., 1993). Desta forma, parte-se da ideia de que linhagens clonais de bactérias (micro-organismos proximamente relacionados) compartilham propriedades que podem ser identificadas e utilizadas para distingui-las das que não são similares (EBERLE & KIESS, 2012).

As técnicas de tipificação são baseadas no fenótipo e no genótipo das bactérias (FOLEY et al., 2009). Os métodos fenotípicos são aqueles que diferenciam as cepas por meio da caracterização dos produtos da expressão gênica, como por exemplo, a presença de antígenos na superfície celular e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (TENOVER et al., 1997). Os métodos genotípicos são baseados na análise da estrutura genética do micro-organismo utilizando-se enzimas de restrição, amplificação de ácido nucléico ou sequenciamento de nucleotídeos (YAN et al., 2003).

Dentre os diversos métodos de tipificação existentes, sejam eles fenotípicos ou genotípicos, a escolha do mais adequado ao objetivo do estudo deve ser baseada na análise de três critérios essenciais: tipicidade, reprodutibilidade e discriminação (HUNTER & GASTON, 1988; HUNTER, 1990; BELKUM et al., 2007; HURST et al., 2009; EBERLE & KIESS, 2012).

A proporção de isolados tipificáveis por um determinado método gerando

resultados interpretáveis está relacionada à tipicidade (FOLEY et al., 2009). Essa propriedade é frequentemente elevada em métodos genotípicos a medida que métodos tradicionais como a sorotipificação e fagotipificação apresentam limitações devido à variação genética, de forma que os laboratórios devem introduzir novos soros e fagos para melhorá-la (OLSEN et al., 1993).

A reprodutibilidade de um dado método de tipificação é avaliada quando são aplicados testes de repetição de um determinado isolado, em ocasiões diferentes, obtendo-se resultados iguais (BELKUM et al., 2007; BEHRINGER et al., 2011). Essa propriedade é especialmente importante para o desenvolvimento de bases de dados confiáveis contendo as cepas conhecidas de uma determinada espécie para comparação e classificação com organismos desconhecidos (OLIVE & BEAN, 1999). Por isso é necessário uma estrita padronização da técnica, de modo a permitir alta reprodutibilidade intra e inter-laboratorial (SCHÜRCH & SOOLINGEN, 2012).

A discriminação ou poder discriminatório é a competência da técnica de diferenciação dos isolados não relacionados (EBERLE & KIESS, 2012) e ao mesmo tempo ser capaz de apresentar a relação de todos os organismos isolados de indivíduos infectados por meio da mesma fonte (OLIVE & BEAN, 1999). Para avaliar a capacidade de discriminação dos métodos de tipificação, HUNTER & GASTON (1988) sugeriram a utilização do índice de diversidade de Simpson que é calculado por meio da probabilidade de duas cepas não relacionadas, originadas de uma determinada população, serem alocadas em grupos diferentes.

Cada técnica apresenta vantagens e desvantagens e nenhuma utilizada isoladamente, irá cumprir todos os requisitos necessários para um resultado adequado ao objetivo do estudo (OLSEN et al., 1993). Por isso é importante uma avaliação detalhada e a compreensão do pesquisador em relação às limitações de cada uma.

Atualmente existem diversas técnicas para realizar a tipificação de *Salmonella* sp. Dentre os métodos fenotípicos, que são considerados os mais tradicionais, estão a sorotipificação (MÜRMANN et al., 2008; XIA et al., 2009; YANG et al., 2010; ABBASSI-GHOZZI et al., 2012), fagotipificação (LACONCHA et al., 1998; MAJTANOVA et al., 2011) e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos (LIU et al., 2011; HUR et al., 2012). Em relação às técnicas moleculares, utilizadas para a caracterização do genótipo da *Salmonella* podem ser destacadas o perfil plasmidial (AKTAS et al., 2007; ABBASSI-GHOZZI et al., 2012), polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD) (BETANCOR et al., 2004; GUIMARÃES, 2010) e eletroforese em campo pulsado (PFGE) (XIA et al., 2009; CHEN, et al., 2011)

### **Métodos fenotípicos**

O fenótipo de uma bactéria refere-se às propriedades verdadeiramente expressas, resultado direto da manifestação do genótipo. Em termos moleculares, o fenótipo representa a coleção de proteínas do qual provém a maior parte das características da célula (TORTORA et al., 2012).

Os mecanismos biológicos implícitos à variabilidade fenotípica de cepas de *Salmonella* sp. e sua repercussão na epidemiologia da doença causada por este patógeno são frequentemente objeto de estudos (CHU et al., 2009; HUR et al., 2011; KOZODEROVIĆ et al., 2011; CAMPIONI et al., 2012).

É importante salientar que a variação genética em *Salmonella* sp. é responsável pela codificação de estruturas como os lipopolissacarídeos, flagelos e

fímbrias bem como a expressão de genes de virulência específicos que alteram a fisiologia celular ou protegem o patógeno das defesas do hospedeiro. Portanto a pressão seletiva para promover o polimorfismo genético responsável por variação antigênica desses micro-organismos é consequência direta da presença das estruturas de superfície, já que são alvos do sistema imune do hospedeiro (FIERER & GUINEY, 2001).

A maioria dos métodos tradicionais apresenta baixa reprodutibilidade em comparação aos métodos genotípicos uma vez que as bactérias, como a *Salmonella*, podem alterar de forma imprevisível a manifestação de produtos celulares (TENOVER et al., 1997). Entretanto ainda possuem um papel importante na detecção de casos esporádicos de salmonelose (OLSEN et al., 1993) e técnicas mais avançadas têm sido associadas para melhorar a habilidade de tipificação das cepas (YAN et al., 2003).

### • Sorotipificação

A sorotipificação é uma das técnicas mais tradicionais, utilizada por muitos anos até os dias atuais em estudos epidemiológicos de *Salmonella* sp. Em espécies de bactérias nos quais utiliza-se este sistema, ele se torna a base de todos os outros métodos de tipificação (OLSEN et al., 1993).

Nessa técnica são utilizados anticorpos específicos para estruturas antigênicas presentes na superfície celular (TENOVER et al., 1997). Essas estruturas são os antígenos capsulares (Vi), antígenos somáticos (O) e antígenos flagelares (H), responsáveis pela classificação de *Salmonella* em sorotipos por meio do esquema de Kauffmann-White (SILVA et al., 2007).

Os antígenos somáticos são carboidratos presentes na parte mais externa dos lipopolissacarídeos que compõem a parede celular, responsáveis pela separação de *Salmonella* em sorogrupos, caracterizados por números arábicos (CDC, 2011). O mesmo antígeno "O" é comum a vários sorotipos (FERREIRA & CAMPOS, 2008). Os antígenos capsulares ocorrem somente nos sorotipos Typhi, Paratyphi C e Dublin que podem ou não apresentá-lo (SILVA et al., 2007). Os antígenos flagelares compõem o flagelo das cepas móveis de *Salmonella* e ocorrem em duas fases denominadas 1 e 2 (CDC, 2011). A fase 1 apresenta os antígenos identificados por letras minúsculas do alfabeto enquanto que os antígenos da fase 2 são designados por números arábicos. Como o número de antígenos flagelares identificados ultrapassa a quantidade de letras do alfabeto, utiliza-se a letra z com um número subscrito (FERREIRA & CAMPOS, 2008). A maioria das cepas apresentam variação de fase que é a capacidade de produzir os dois tipos de flagelos com características antigênicas diferentes (SILVA et al., 2007).

GUIMARÃES (2010) salientou a importância da sorotipificação preliminar nas indústrias para analisar a correlação entre os isolados de *Salmonella* sp. ao longo da cadeia produtiva, fornecendo indícios de fontes de infecção como ração animal e equipamentos. Entretanto, a identificação antigênica em laboratórios oficiais como a Fundação Oswaldo Cruz é indispensável em estudos epidemiológicos.

Os sorotipos pertencentes à *Salmonella enterica* subespécie *enterica* são denominados geralmente pelo nome relacionado ao local onde foram isolados pela primeira vez, a medida que os sorovares pertencentes as outras subespécies são designados pela fórmula antigênica (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Atualmente são descritos 2.610 sorotipos por meio do esquema Kauffmann-

White e cerca de 60% pertencem à subespécie *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Aproximadamente 99% das cepas isoladas de infecções por *Salmonella* em humanos pertencem a essa subespécie, demonstrando assim sua importância no contexto da saúde pública (SILVA et al., 2007).

MÜRMAN et al. (2008) ao analisarem amostras de alimentos contendo ovos, maionese e carne de aves envolvidos em 10 surtos de salmonelose confirmados no Rio Grande do Sul, encontraram 100% das cepas sorotipadas como Enteritidis. Semelhantemente, YANG et al. (2010) utilizando o esquema de Kauffmann-White em 359 isolados de *Salmonella* provenientes de retalhos de carne de aves, suínos, bovinos e cordeiros comercializados na China, detectaram o sorotipo Enteritidis com maior frequência, seguido pelos sorotipos Typhimurium e Shubra. Por outro lado, ABBASSI-GHOZZI et al. (2012) encontraram *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em maior prevalência em amostras de carnes cruas na Tunísia.

Em contrapartida aos sorovares mais comumente encontrados em amostras de alimentos, MOREIRA et al. (2008) isolaram 52 cepas de *Salmonella* sp. de um total de 363 carcaças de frango em Goiás, onde *Salmonella enterica* sorovar Albany foi o mais prevalente.

Relatos do Centro Nacional de Referência em *Salmonella* (CNR), sediado no Instituto Pasteur da França, apontam para o sorotipo Enteritidis como o mais frequentemente correlacionado a surtos alimentares. Entretanto houve um aumento marcado na ocorrência da variante monofásica de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium no ano de 2009, sendo considerado um fenômeno encontrado em âmbito mundial (FRANÇOIS-XAVIER & SIMON, 2009).

Portanto a sorotipificação é um método tradicional que fornece informações essenciais, porém com certas limitações já que a maioria dos surtos alimentares são correlacionados a somente alguns sorovares mais prevalentes (OLSEN et al., 1993). Deste modo é necessário que outras técnicas de tipificação sejam aplicadas em conjunto para melhorar a caracterização das cepas analisadas (YAN et al., 2003).

### • Fagotipificação

A fagotipificação é um método de tipificação valioso no contexto epidemiológico, pois é capaz de diferenciar cepas de *Salmonella* dentro de um sorotipo em particular (YAN et al., 2003). A técnica determina a qual fago (bacteriófago) a bactéria é suscetível. Os fagos são vírus bacterianos altamente especializados pois infectam somente membros de uma espécie em particular ou de determinadas linhagens dentro de uma espécie, causando lise celular após a infecção (TORTORA et al., 2012).

A fagotipificação é uma técnica menos onerosa em comparação a outras e vários esquemas foram desenvolvidos para alguns sorotipos em particular como *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium (ANDERSON et al., 1977), *Salmonella enterica* sorovar Infantis (KASATIYA, 1978) e *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (WARD, 1987).

O procedimento consiste na semeadura de culturas puras de *Salmonella* em placa contendo ágar onde são adicionados diferentes tipos de fagos e observado a capacidade de infecção e lise das células, refletido por meio da falha do crescimento bacteriano (TORTORA et al., 2012). Portanto as cepas que são suscetíveis à infecção pelo mesmo fago são alocadas no mesmo fagotipo (OLSEN et al., 1993).

A fagotipificação tem sido utilizada para descrever clones com graves

implicações em saúde pública como o fagotipo DT 104 presente no sorovar Typhimurium caracterizado por apresentar multirresistência a antimicrobianos (WHO, 2005). Entretanto alguns fagotipos tendem a ser comuns como o caso do DT 104, sendo inadequado a utilização da fagotipificação isoladamente na investigação de surtos de salmonelose. Para tanto, é recomendada a aplicação de outros métodos afim de detectar diversidades dentro do próprio fagotipo, promovendo uma subtipagem adicional, agregando informações ao estudo (LAN et al., 2003).

Recentemente, BOXSTAEL et al. (2012) caracterizaram cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium por meio de sorotipificação, suscetibilidade a antimicrobianos e fagotipificação, apontando para associação de técnicas fenotípicas. Encontraram como combinação mais prevalente de resistência a antimicrobianos/fagotipo o sorovar Typhimurium DT 104 penta-resistente (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina - ACSSUT) isolados de humanos e carne de origem suína, sugerindo assim a hipótese de transferência de resistência aos humanos via consumo da carne.

MAJTANOVA et al. (2011) ao analisarem a tendência de fagotipos de cepas de *Salmonella* de 1995 a 2009 na Eslováquia, encontraram maior prevalência para os fagotipos PT8, PT4 e PT6 relacionados ao sorovar Enteritidis e DT104 e U302 relacionados ao sorovar Typhimurium, demonstrando a utilização da técnica para o monitoramento dos perfis das cepas ao longo do tempo.

LACONCHA et al. (1998) propuseram a utilização de técnicas genotípicas em associação a fagotipificação de cepas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isoladas de diferentes nichos ecológicos e de quatro surtos de gastroenterite afim de aumentar o poder discriminatório da análise. A discriminação da fagotipificação foi baixa devido a predominância do fagotipo PT4. OLSEN et al. (1993) apontaram para a inadequação da técnica quando um tipo específico se torna dominante em um estudo. Entretanto, ao serem aplicadas eletroforese em campo pulsado (PFGE) e polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD), aumentou-se o poder discriminatório das análises, auxiliando na investigação de surtos alimentares causados por *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis (LACONCHA et al., 1998).

Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF) demonstraram a frequência de fagotipos de cepas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium provenientes de amostras de frangos congelados comercializados em todas as regiões do Brasil. Pode-se evidenciar a disseminação dos fagotipos PT1 (74.6%) e PT4 (19.5%) em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis no Brasil durante o período de análise (entre 2004 e 2006). Em relação ao sorovar Typhimurium foram identificados somente dois fagotipos, PT193 (82.3%) e PT208 (17.6%).

Apesar de vários estudos apontarem para a frequência de um determinado fagotipo ao longo do tempo, a conversão pode ocorrer devido a mudanças que ocorrem naturalmente (OLSEN et al., 1993). Segundo MAJTÁNOVÁ & MAJTÁN (2009) a conversão de fagotipos é um fenômeno conhecido que pode ser explicado tanto pela aquisição de plasmídeos ou novos fagos lisogênicos como por mudanças nos receptores de fagos presentes na superfície da célula bacteriana.

Os resultados obtidos pela fagotipificação dependem da experiência de cada laboratório e necessitam diretamente do apoio dos centros de referência que possuem o controle dos fagos. Apesar de apresentar certas limitações como outros métodos fenotípicos, é considerado uma importante ferramenta utilizada na

investigação epidemiológica dos sorovares mais comuns de *Salmonella* sp. (MAJTANOVA et al., 2011).

- **Sensibilidade a antimicrobianos**

O isolamento e identificação de micro-organismos patogênicos que apresentam graves implicações em saúde pública bem como a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana são de extrema importância no contexto clínico e epidemiológico (MOTA et al., 2005).

A maioria dos casos de salmonelose em humanos provoca gastroenterite auto-limitante caracterizada por diarreia, febre e cólicas abdominais, não sendo necessário a utilização de terapia antimicrobiana (BOXSTAEL et al., 2012). Entretanto, em casos severos de infecções sistêmicas é necessário a utilização de antibióticos, sendo o grupo das fluoroquinolonas e terceira geração de cefalosporinas, o tratamento de escolha. Outras drogas como cloranfenicol, ampicilina, amoxicilina e sulfametoxazol-trimetoprim são utilizados ocasionalmente como alternativa no tratamento (WHO, 2005).

A metodologia para determinação do perfil de resistência a antimicrobianos bem como a escolha dos fármacos e os parâmetros para controle de qualidade dos testes são recomendados pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). O CLSI é uma organização internacional e interdisciplinar cujo objetivo é promover o desenvolvimento de normas e procedimentos laboratoriais padronizados no intuito de otimizar os serviços de saúde (CLSI, 2011). O princípio do procedimento denominado disco-difusão consiste em utilizar discos de papel embebidos nos antimicrobianos a serem testados em uma placa contendo ágar previamente inoculada e incubada com o micro-organismo teste. Após incubação em estufa é avaliado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, representada por uma zona clara ao redor (TORTORA et al., 2012).

A utilização indiscriminada de drogas antimicrobianas não somente para tratamento de doenças na medicina humana e veterinária, mas também para melhorar os índices zootécnicos dos animais de produção têm contribuído para o surgimento de bactérias multirresistentes (HUR et al., 2012). Existem indícios de que esta utilização indevida nos animais de produção podem transmitir resistência a antibióticos aos seres humanos por meio de seus produtos e derivados (MOTA et al., 2005). Desse modo, segundo KOZODEROVIĆ et al. (2011) as cepas de *Salmonella* sp. tendem a adquirir diferentes determinantes de resistência os quais podem ser utilizados como ferramenta de tipificação.

Diante disso a determinação da resistência aos agentes antimicrobianos é uma ferramenta variável, pois o genoma bacteriano é extremamente dinâmico e a maioria dos fatores que determinam a resistência são carregados por elementos móveis como os plasmídeos, transposons e integrons (OLSEN et al., 1993; MOTA et al., 2005).

M'IKANATHA et al., (2010) analisaram amostras de carne de frango comercializadas nos Estados Unidos e encontraram 22.2% das amostras contaminadas por *Salmonella* sp. incluindo cepas que carregavam um gene de resistência transmitido por plasmídeo, o qual conferiu resistência a ceftiofur utilizado na avicultura e ceftriaxone utilizado no tratamento de salmonelose em humanos.

CAMPIONI et al. (2012) ao caracterizarem 128 cepas de *Salmonella enterica*

sorovar Enteritidis de origem humana e alimentar entre os anos de 1986 e 2010 no estado de São Paulo encontraram perfil de resistência ao ácido nalidíxico em 28.1% das cepas e somente 0.8% das cepas foram resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprim e estreptomicina, demonstrando assim a evolução do perfil de resistência ao longo dos anos.

A propagação de cepas multirresistentes entre os animais é frequentemente rastreada utilizando-se o perfil de sensibilidade a antimicrobianos, preferencialmente combinado com outro método de tipificação (OLSEN et al., 1993).

Nos últimos anos o aumento de sorotipos multirresistentes, como Typhimurium e Newport, tem sido alvo de pesquisas e vigilância epidemiológica por causarem graves implicações em saúde pública. Em particular, o sorotipo Typhimurium fagotipo DT 104 causa grande preocupação, pois comumente apresenta um gene codificado para penta-resistência: ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina – ACSSuT (HUR et al., 2012).

MAJTÁNOVÁ & MAJTÁN (2009) realizaram um estudo com enfoque na característica de multirresistência a antibióticos de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium fagotipos DT104, DT20a e DT120 isolados de humanos, demonstrando penta-resistência (ACSSuT) em 71.4, 68.9 e 47.4% das cepas respectivamente. Os resultados também apontaram para DT20a como o fagotipo mais prevalente.

O Sistema Nacional de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana (NARMS) junto ao Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) nos Estados Unidos realizam o monitoramento de resistência a antibióticos das bactérias entéricas isoladas de humanos. Dados recentes apontam para uma prevalência de 2% dos isolados resistentes ao ácido nalidíxico (total 2474), do qual o sorovar mais frequente foi o Enteritidis; e 2.8% dos isolados apresentaram resistência ao ceftriaxone (total 2474) sendo o sorovar Newport o mais frequente (CDC, 2010).

Em relação ao Brasil, no ano de 2004 a ANVISA implantou o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), visando análise de risco da disseminação de resistência em cepas de *Salmonella* sp. e *Enterococcus* sp. As amostras foram provenientes de carcaças de frango congeladas de todas as regiões do Brasil entre 2004 e 2006 e analisadas conforme o perfil de suscetibilidade a seis classes de antimicrobianos (18 fármacos no total), escolhidos sob o ponto de vista da utilização em humanos e animais. Após o isolamento de 250 cepas de *Salmonella* sp., os resultados evidenciaram 98 perfis de multirresistência (> 2 classes de antimicrobianos) em 76.8% das cepas.

Um dado preocupante encontrado foi o perfil de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis que apresentou 91.8% de resistência para três ou mais classes de antimicrobianos testados. Salienta-se também a importância do sorovar Heidelberg resistente às cefalosporinas, incluindo as de 3ª geração utilizadas no tratamento de salmonelose invasiva no homem e como uso terapêutico ou profilático em animais de produção (BRASIL, 2008).

Nesse sentido, verifica-se que a análise do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos é uma ferramenta de tipificação de extrema importância para análise e monitoramento epidemiológico de linhagens de *Salmonella* sp. que nos últimos 30 anos tem emergido com fenótipos multirresistentes causando graves implicações em saúde pública (HUR et al., 2012).

### **Métodos genotípicos**

O genótipo representa as propriedades potenciais de um determinado organismo por meio da composição genética que codifica todas as suas características particulares (TORTORA et al., 2012).

Os métodos fenotípicos apresentam a desvantagem de analisar somente as características expressas pelo genótipo do organismo em um determinado momento podendo ou não refletir a relação filogenética atual entre um grupo de isolados (DIJKSHOORN & TOWNER, 2001). Portanto, o desenvolvimento de métodos genotípicos permitem a análise da genética microbiana minimizando assim as desvantagens advindas dos métodos fenotípicos, principalmente em relação a reprodutibilidade e tipicidade das técnicas, e em alguns casos, também proporcionam o desenvolvimento de bases de dados com a caracterização de vários micro-organismos (OLIVE & BEAN, 1999).

Um exemplo atual de compartilhamento de dados é a PulseNet. Localizada nos Estados Unidos e coordenada pelo CDC a PulseNet é uma rede nacional de laboratórios de saúde pública e de agências reguladores de alimentos cujos participantes enviam os resultados de tipificação de bactérias de origem alimentar como *Salmonella* e *Campylobacter* utilizando a técnica molecular PFGE. Dessa maneira os pesquisadores podem realizar comparações dos resultados encontrados por meio dos padrões contidos no banco de dados (CDC, 2012)

Recentemente, métodos mais avançados baseados em técnicas moleculares têm sido desenvolvidos como ferramenta epidemiológica tanto para diagnóstico bacteriológico como para rastrear e caracterizar cepas de *Salmonella* sp. (KUMAR et al., 2008). Desta forma, com os dados obtidos, pode-se construir dendogramas que apresentam a similaridade existente entre amostras filogeneticamente próximas (MARTINEZ & TADDEI, 2008).

A escolha do método deve ser baseada nas limitações de cada um, além de fatores como custo, tempo e dificuldades de execução (OLIVE & BEAN, 1999). KUMAR et al. (2008) apontaram para a associação de diferentes métodos para melhorar a capacidade de tipificação das cepas de *Salmonella* sp.

- **Eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

A Eletroforese em campo pulsado, do inglês *Pulsed-field gel electrophoresis* – PFGE, é considerado o “padrão-ouro” dos métodos moleculares (OLIVE & BEAN, 1999), sendo referência em agências de saúde pública por sua acurácia e alta reprodutibilidade entre os laboratórios (GAUTOM, 1997). Essa técnica desenvolvida em meados dos anos 80 tem se provado uma importante ferramenta epidemiológica que permite a comparação cromossômica entre os organismos (DIJKSHOORN & TOWNER, 2001).

O procedimento é baseado na utilização de enzimas de restrição de corte raro (endonucleases) que gera fragmentos de alto peso molecular a partir da clivagem do DNA cromossômico, separados por meio da aplicação de um campo elétrico em direções alternadas (LIEBANA, 2002). No momento em que ocorre a troca na direção do campo elétrico as moléculas de DNA são forçadas a se reorientarem paralelamente ao campo antes de migrarem em direção ao polo positivo, sendo esta a principal diferença entre a PFGE e a eletroforese em gel de agarose convencional. O tempo gasto nesse processo de mudança de orientação é denominado tempo de pulso, no qual os fragmentos menores se adaptam mais rapidamente do que os maiores (MAGALHÃES et al., 2005).

Uma enzima de restrição reconhece e cliva somente uma determinada sequência de bases nucleotídicas no DNA sempre da mesma maneira (TORTORA et al., 2012). Assim, a escolha das enzimas é uma etapa importante, pois devem gerar poucos fragmentos permitindo a análise de todo o DNA cromossomal da bactéria (MARTINEZ & TADDEI, 2008).

A interpretação da análise é realizada por meio da visualização das bandas de fragmentos de DNA em gel de agarose, corados geralmente por brometo de etídio, que ao ser submetido à luz ultravioleta emite fluorescência (TENOVER et al., 1995).

CHEN et al. (2011) empregaram duas enzimas de restrição para tipificar 173 cepas de *Salmonella enterica* sorovar Schwarzengrund isoladas de carne de aves. Obtiveram como resultado um total de 23 e 16 padrões de PFGE por meio da digestão do DNA cromossomal com XbaI and AvrII respectivamente, demonstrando a maior capacidade de discriminação da enzima XbaI.

Dentre as aplicações do PFGE em *Salmonella* sp. pode-se citar o mapeamento físico de cromossomos, acompanhamento da evolução de clones bacterianos em um determinado habitat além de estudos taxonômicos (STRUELENS et al., 2001).

XIA et al. (2009) ao utilizarem PFGE em 16 isolados de *Salmonella* provenientes de diferentes alimentos na Flórida encontraram diversidade genética entre todos com índice de similaridade de 46 e 72% por meio da análise com as enzimas XbaI e BlnI respectivamente, provando a adequação da técnica em detectar a diversidade de cepas.

Ao tipificarem 85 cepas *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium DT104 provenientes de suínos saudáveis utilizando as enzimas XbaI e SpeI, PERRON et al. (2007) obtiveram 62 genótipos diferentes, provando o alto poder discriminatório da técnica. Além disso, detectaram uma alta percentagem desses fagotipos com perfis multirresistentes a antimicrobianos, demonstrando a associação de métodos no estudo da epidemiologia do sorovar Typhimurium.

Uma das limitações da técnica é o tempo exigido para execução dos protocolos, além do processo de extração de DNA ser laborioso, exigindo a fixação da bactéria em uma matriz de agarose (GAUTOM, 1997). Porém, essa etapa além de conferir proteção mecânica às moléculas de DNA também permite estabilidade das amostras por tempo indefinido contribuindo para a reprodutibilidade do método (MAGALHÃES et al., 2005).

Analisando-se linhagens de *Salmonella* sp. por meio de PFGE é imprescindível a avaliação dos dados epidemiológicos para uma interpretação adequada dos dados. Conforme TENOVER et al. (1995) bactérias que possuem uma relação epidemiológica, envolvidas em surtos ou epidemias devem apresentar padrões indistinguíveis e por outro lado, aquelas não relacionadas devem apresentar padrões distintos por meio do PFGE.

MÜRMAN et al. (2008) analisaram amostras de alimentos envolvidos em dez surtos de toxinfecção alimentar no Rio Grande do Sul. Todas as 14 cepas submetidas à sorotipificação foram identificadas como *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis e apresentaram um único padrão no PFGE, utilizando-se a enzima XbaI. Assim, apesar dos surtos não serem relacionados, o resultados obtidos demonstram a relação clonal entre essas cepas, contribuindo para elucidar a origem dos casos de salmonelose reportados.

Portanto a PFGE é uma técnica com alto poder discriminatório, adequada

para a caracterização de linhagens e rastreamento de surtos alimentares, mas que deve ser interpretada juntamente com dados epidemiológicos afim de se evitar conclusões errôneas (MAGALHÃES et al., 2005).

- **Perfil plasmidial**

A análise do perfil plasmidial tem se mostrado uma importante ferramenta epidemiológica para tipificar cepas de *Salmonella* (BORREGO et al., 1992; AKTAS et al., 2007; ABBASSI-GHOZZI et al., 2012).

Os plasmídeos são pequenas moléculas de DNA de fita dupla, circulares, auto-replicativas, não conectadas ao cromossomo bacteriano principal. Podem ser transferidos de uma bactéria a outra, podendo transportar genes para atividades como resistência aos antibióticos, tolerância a metais tóxicos, produção de toxinas e síntese de enzimas (TORTORA et al., 2012).

Durante a divisão celular as bactérias filhas recebem cópias dos plasmídeos, permitindo a comparação de isolados, já que bactérias pertencentes à mesma linha clonal transportam o mesmo plasmídeo (FOLEY et al., 2009).

O princípio do método se baseia no padrão criado quando plasmídeos são separados com base no peso molecular por eletroforese em gel de agarose, após a separação inicial do DNA cromossômico (UENO & JORGE 2001).

Entretanto, dois plasmídeos de mesmo tamanho molecular, mas com diferentes sequências de DNA serão visualizados da mesma maneira. Desta forma, a confiabilidade da técnica pode ser melhorada utilizando-se as enzimas de restrição, que irão clivar os plasmídeos em diferentes locais produzindo moléculas de diferentes tamanhos (*fingerprintings*) separadas por eletroforese em gel apresentando um padrão característico de bandas para cada plasmídeo (OLSEN et al., 1993).

UENO & JORGE (2001) afirmam que cepas que apresentem diferentes padrões de *fingerprintings* certamente possuem plasmídios distintos e assim não possuem relação epidemiológica. Micro-organismos que produzem *fingerprintings* diferentes em um ou outro fragmento de DNA devem ser considerados intimamente relacionados, sendo necessário dados suplementares fornecidos pela aplicação de outras técnicas para uma caracterização mais precisa.

Um fator desfavorável ao método está relacionado a mobilidade dos plasmídeos que podem ser adquiridos ou perdidos sob pressão seletiva, prejudicando a análise da relação de parentesco entre os isolados (FOLEY et al., 2009). Por isso, é importante que a análise plasmidial seja associada a outras técnicas para excluir a presença de um clone (UENO & JORGE 2001).

Plasmídeos que carregam genes de virulência são denominados plasmídeos de virulência (*virulence plasmids* – VPs), cuja presença nos sorovares que apresentam maiores implicações em saúde pública como Typhimurium e Enteritidis é conhecida (FOLEY & LYNNE, 2008). Os plasmídeos também podem intermediar a transferência de resistência a antimicrobianos entre bactérias que são resistentes para outras que não são. Os fatores R (fatores de resistência) são plasmídeos que normalmente carregam um grupo de genes responsáveis pela resistência (determinante r) e um grupo que controla a replicação do plasmídeo e a conjugação denominado fator de transferência de resistência – FTR (TORTORA et al., 2012).

CHU et al. (2009) caracterizaram 67 cepas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis isoladas de humanos e aves, em Taiwan, encontrando o plasmídeo de

virulência 60-Kb pSEV em 65 cepas. Além disso, encontraram forte correlação entre as análises do perfil plasmidial com a genotipagem por PFGE indicando a propagação de clones de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis entre humanos e aves, confirmando a transmissão deste sorovar aos humanos por meio do consumo da carne desses animais.

AKTAS et al. (2007) ao utilizarem a análise do perfil plasmidial apontaram para o bom poder discriminatório da técnica, ao diferenciar 25 cepas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em seis perfis e 12 cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium em cinco perfis.

BORREGO et al. (1992) destacaram a associação de técnicas para a caracterização de *Salmonella* sp. isoladas do meio ambiente, alimentos e humanos. Para amostras relacionadas a surtos alimentares a fagotipagem se mostrou mais adequada em identificar os isolados idênticos enquanto que o perfil plasmidial foi mais apropriado para as amostras do meio ambiente. Diante disso, o perfil de sensibilidade a antimicrobianos atuou como um importante marcador de cepas relacionadas aos alimentos envolvidos em toxinfecção alimentar.

SJÖLUND-KARLSSON et al. (2010) realizaram um estudo com a colaboração de 54 participantes do NARMS, a fim de verificarem a resistência à quinolonas mediada por plasmídeos de *Salmonella enterica* isoladas de humanos, alimentos e animais. Os resultados apresentaram uma prevalência de 0.3% dos isolados de humanos contendo plasmídeos de resistência e nenhuma cepa proveniente de amostras de animais ou alimentos abrigavam esse mecanismo. Apesar dos resultados, a recomendação dos colaboradores da pesquisa foi a utilização comedida de antimicrobianos na medicina humana e veterinária a fim de evitar a disseminação dos plasmídeos de resistência entre cepas de *Salmonella* e outras enterobactérias.

- **Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD-PCR)**

Essa técnica, conhecida também por *Random Amplification of Polimorphic DNA* (RAPD-PCR) é baseada na reação em cadeia da polimerase, fundamentada na amplificação de DNA de iniciadores (*primers*) com baixa relação de complementariedade ao DNA-alvo e de sequência aleatória para dirigir a reação de amplificação. Assim, elimina-se a necessidade do conhecimento prévio da sequência a ser amplificada, podendo ser obtido mais de 50 fragmentos amplificados do DNA (CASTIGLIONI & BICUDO, 2003; MARTINEZ & TADDEI, 2008). Os produtos são então analisados por eletroforese por meio da “impressão digital” do DNA ou “*fingerprinting DNA*”, que são os perfis dos fragmentos diferidos quanto à relação das cepas investigadas (POWER, 1996).

As principais diferenças entre RAPD e o PCR convencional está relacionado a utilização de um único oligonucleotídeo (sequência mais curta, geralmente 10 pb) como *primer* ao invés de um par (CASTIGLIONI & BICUDO, 2003), e a menor temperatura de anelamento, entre 25 e 40°C (POWER, 1996).

A reprodutibilidade da técnica é frequentemente discutida e dentre os fatores que podem interferir pode-se citar a temperatura de anelamento dos *primers*, concentração e qualidade do DNA molde a ser amplificado, qualidade da Taq-polimerase utilizada e o termociclador (CASTIGLIONI & BICUDO, 2003).

BETANCOR et al. (2004) caracterizaram cepas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis provenientes de humanos e alimentos no Uruguai, empregando

cinco *primers*: P1254, OPB-17, 23L, OPA-4 e OPB-15. Cada cepa foi analisada por quatro vezes e por dois técnicos diferentes que utilizaram amostras recém-preparadas, obtendo alta reprodutibilidade na técnica. Além disso, a maioria dos isolados (48 de 62) mostraram o mesmo perfil de RAPD, sugerindo a circulação de uma cepa endêmica no país, originada de alimentos de origem avícola e transmitida aos seres humanos, causando salmonelose.

As vantagens da técnica estão relacionadas à rapidez, custo relativamente baixo, tecnicamente possível de ser realizado pela maioria dos laboratórios e teoricamente aplicável a qualquer organismo (POWER, 1996).

TOZETTO (2006) utilizaram RAPD para analisar 102 cepas de *Salmonella* sp. provenientes de amostras clínicas de surtos e casos esporádicos de salmonelose detectados em sete regiões do estado do Paraná. Foram utilizados na realização da técnica seis iniciadores, havendo boa reprodutibilidade e alto poder discriminatório, distinguindo 84 cepas de *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis em 11 grupos diferentes. A maior variabilidade genética ocorreu entre as amostras relacionadas aos casos esporádicos.

GUIMARÃES (2010) submeteram 86 isolados de *Salmonella* sp. provenientes de fezes e carcaças de suínos à análise gênica por RAPD utilizando o *primer* P1254 (5' CCGCAGCCAA 3'). O sorovar Typhimurium foi o mais prevalente no estudo, produzindo cinco grupos clones e três isolados distintos, porém com similaridade maior que 80% com pelo menos um dos grupos. Os resultados apontam para o risco de transmissão de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium presentes nas fezes de suínos ao longo da cadeia produtiva, sendo necessário a aplicação de medidas sanitárias a campo, afim de se evitar a contaminação do produto final.

Por todas estas considerações acerca da diversidade do gênero bacteriano abordado e da dinamicidade dos recursos para diagnóstico, a tipificação de micro-organismos constitui uma ferramenta analítica a ser empreendida de forma isolada ou em associação de métodos, no âmbito clínico e/ou experimental.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos de tipificação de *Salmonella* sp. apresentam diferentes características como tempo de execução, custo e poder discriminatório que devem ser analisados adequadamente no momento da definição de sua utilização.

Diversas pesquisas apontam para a associação de técnicas no intuito de melhorar a capacidade discriminatória, produzindo assim resultados mais confiáveis. Além disso, a interpretação de dados epidemiológicos juntamente com os dados obtidos pelas técnicas é imprescindível para a conclusão do estudo.

A circulação de sorovares portadores de plasmídeos de virulência assim como a emergência de cepas multirresistentes devem ser alvo constante dos programas de vigilância epidemiológica, pois auxiliam a compreensão da dinâmica de novos casos e surtos de salmonelose. Além disso, a detecção de similaridade genética entre diferentes isolados possui grande importância para a identificação da fonte de transmissão de um determinado surto e também da circulação de clones importantes em saúde pública como o fagotipo DT104 pertencente a *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium.

Com o advento da biologia molecular novos métodos foram criados melhorando de forma significativa a capacidade discriminatória das técnicas, e com sua constante utilização, espera-se que a tipagem molecular possa se tornar

rotineira nos laboratórios de saúde pública, contribuindo assim para a melhora dos sistemas de vigilância epidemiológica em *Salmonella* sp.

Portanto a caracterização de micro-organismos patogênicos zoonóticos, como a *Salmonella* sp., é de extrema importância no contexto da saúde pública, onde todas as informações obtidas fornecem subsídios fundamentais para medidas de controle e prevenção de doenças. Assim, compete aos profissionais da saúde bem como as autoridades sanitárias rastrear esses patógenos permitindo o conhecimento do perfil de determinada região e contribuindo de forma direta para a implementação da vigilância epidemiológica ao longo do tempo.

## REFERÊNCIAS

ABBASSI-GHOZZI, I.; JAOUANI, A.; HAMMAMI, S.; MARTINEZ-URTAZA, J.; BOUDABOUS, A.; GTARI, M. Molecular analysis and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from raw meat marketed in the area of “Grand Tunis”, Tunisia. **Pathologie Biologie**, Paris, v.60, n. 5, p. 49-54, 2012.

AKTAS, Z.; MARTIN, D.; KAYACAN, C.B.; DIREN, S.; THRELFALL E.J. Molecular characterization of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by plasmid analysis and pulsed-field gel electrophoresis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 541-545. 2007.

ANDERSON, E.S.; WARD, L.R.; SAXE, M.J.; DE SA, J.D. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium. **Journal of Hygiene**, Londres, n. 78, p. 297-300, 1977.

BEHRINGER, M.; MILLER, W.; OYARZABAL, O. A. Typing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from live broilers and retail broiler meat by *flaA* RFLP, MLST, PFGE and REP-PCR. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, n. 84, p. 194-201, 2011.

BELKUM, V. A.; TASSIOS, P.T.; DIJKSHOORN, L. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, Wiesbaden, n. 13, p.1–46, 2007.

BERCHIERI JÚNIOR, A.; FREITAS NETO, O.C. Salmoneloses. In: **Doenças das Aves**. 2.ed. Campinas, São Paulo: Facta, 2009. p.435-456.

BETANCOR, L.; SCHELOTTO, F.; MARTINEZ, A.; PEREIRA, M.; ALGORTA, G.; RODRÍGUES, M.A.; VOGNOLI, R.; CHABALGOITY, J.A. Random Amplified Polymorphic DNA and Phenotyping Analysis of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Isolates Collected from Humans and Poultry in Uruguay from 1995 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 42, n. 3, p.1155-1162, 2004.

BORREGO, J. J.; CASTRO, D.; JIMENEZ-NOTARIO, M.; LUQUE, A.; MARTINEZ-MANZANARES, E.; RODRIGUEZ-AVIAL, D.; PICAZO, J. J. Comparison of

epidemiological markers of Salmonella strains isolated from different sources in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 30, n. 12, p. 3058–3064, 1992.

BOXSTAEL, S. V.; DIERICK, K.; VAN HUFFEL, X.; UYTENDAELE, M.; BERKVENS, D.; HERMAN, L.; BERTRAND, S.; WILDEMAUWE, C.; CATRY, B.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 913-918, 2012.

BRASIL, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF. Janeiro, 2008.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A. M. M.; FALCAO, J. P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of Salmonella Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, Londres, p. 1-11, 2012.

CASTIGLIONI, L.; BICUDO, H. E. M. C. A Técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e suas aplicações para estudos em genética molecular. **Revista UNORP**, São José do Rio Preto, v. 3, n. 2, p. 63-77, 2003.

CDC. Department of Health and Human Services. PulseNet. Acesso em 25/07/2012, <http://www.cdc.gov/pulsenet/>.

CDC. **National Salmonella Surveillance Overview**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011. Acesso em 30/07/2012, [http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveilOverview\\_508.pdf](http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveilOverview_508.pdf)

CDC. National Antimicrobial Resistance Monitoring System: Enteric bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2010. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. Acesso em 30/07/2012, <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/default.htm>.

CHEN, M. H.; HWANG, W. Z.; WANG, S. W.; SHIH, Y. C.; TSEN, H. Y. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) Analysis for Multidrug Resistant Salmonella enterica Serovar Schwarzengrund Isolates Collected in Six Years (2000-2005) Retail Chicken Meat in Taiwan. **Food Microbiology**, Londres, v. 28, n. 3, p. 399-405, 2011.

CHU, C.; WONG, D. W.; WANG, M. H.; LIN, H. H.; CHEN, Y. S.; TIEN, N.; SHIH, M. C.; CHEN, T. H.; CHIU, C. H. Genotyping, plasmid analysis, and antimicrobial susceptibility of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolates from humans and chickens in central Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, Taipei, v. 108, n. 10, p. 765-771, 2009.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first Informational Supplement. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, v. 31, n. 1, 2011.

DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. An Introduction to the Generation and Analysis of Microbial Typing Data. In: DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. J.; STRUELENS, M. **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**. Amsterdam: Elsevier, 2001. cap. 1, p. 1-30.

EBERLE, K. N.; KIESS, A. S. Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, p. 255-264, 2012.

FERREIRA, E. O, CAMPOS, L.C. Salmonella. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. Ed.Atheneu, 2008. Cap. 43, p. 329-338.

FIERER, J., GUINEY, D. G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of Salmonella infection. **Journal of Clinical Investigation**, Nova Iorque, v. 107, p. 775–780, 2001.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M.; NAYAK, R. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. **Infections, Genetic and Evolution**, Amsterdam, v. 9, p. 430–440, 2009.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food animal-associated Salmonella challenges, pathogenicity and antimicrobial resistance. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 86, p. 173–187, 2008.

FOXMAN, B.; ZHANG, L.; KOOPMAN, J.S.; MANNING, S.D.; MARRS, C.F. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives & Innovations**, v.2, n.10, 2005.

FRANÇOIS-XAVIER, W; SIMON, H.L. Centre National de Référence des Salmonella. Rapport d'activité annuel. **Institut Pasteur**, Paris. 2009. 71p.

GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 35, n. 11, p.2977-80, 1997.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X. Supplement 2003-2007 (Nº47) to the White-Kauffmann – Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v. 161, p. 26-29, 2010.

GUIMARÃES, A.R. **Resistência aos antimicrobianos, diversidade e relação epidemiológica de bactérias do gênero *Salmonella* spp. isoladas na granja de terminação e abate de suínos**. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em medicina veterinária) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

HUNTER, P. R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, p. 1903-1906, 1990.

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

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J. H. Antimicrobial resistance of Salmonella isolated from food animals: A review. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 819–830, 2012.

HUR, J.; KIM, J. H.; PARK, J. H.; LEE, Y. J.; LEE, J. H. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant Salmonella Enteritidis strains isolated from poultry. **The Veterinary Journal**, Londres, v. 189, p. 306–311, 2011.

HURST, S. F.; KIDD, S. E.; MORRISSEY, C. O.; SNELDERS, E.; MELCHERS, W. J. G.; CASTELLI, M. V.; MELLADO, E.; SIMMON, K.; PETTI, C. A.; RICHARDSON, S.; ZHANG, S.; ROMANELLI, A. M.; WICKES, B. L., DE VALK, H. A.; KLAASSEN, C. H. W.; BALAJEE, S. A. Interlaboratory reproducibility of a single-locus sequence-based method for strain typing of *Aspergillus fumigatus* **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 47, p. 1562–1564, 2009.

KASATIYA, S.; CAPRIOLI, T.; CHAMPOUX, S. Bacteriophage typing scheme for *Salmonella infantis*. **Journal of Clinical Microbiology**, Whashington, v. 10, n. 5, p. 637–640, 1978.

KOZODEROVIĆ, G.; VELHNER, M.; JELESIĆ, Z.; STOJANOV, I.; PETROVIĆ, T.; STOJANOVIĆ, D.; GOLIĆ, N. Molecular typing and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from poultry, food and humans in Serbia. **Folia Microbiologica**, Delft, v. 56, p. 66-71, 2011.

KUMAR, R.; SURENDRAN, P.K.; THAMPURAN, N. Molecular Fingerprinting of *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Typhimurium and *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* Derby Isolated from Tropical Seafood in South India. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 40, n. 1, p. 95–100, 2008.

LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I.; GARAIZAR, J. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis strains. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 40, p. 27-34, 1998.

LAN, R.; DAVISON, A. M.; REEVES, P. R.; WARD, L. R. AFLP analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates of phage types DT 9 and DT 135: diversity within phage types and its epidemiological significance. **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 841-850, 2003.

LÁZARO, N. S.; TIBANA, A.; REIS, E. M. F.; RODRIGUES, D. P.; QUINTAES, B.; HOFER, E. Padrão de susceptibilidade a antimicrobianos e perfil plasmidial em *Salmonella* Muenster isoladas de suínos e do ambiente de abatedouros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 2, p.65–70, 2004.

LIEBANA, E. Molecular tools for epidemiological investigations of *S. entérica* subspecies *entérica* infections. **Research in Veterinary Science**, Londres, v. 72, p.169-75, 2002.

LIM, H.; LEE, K. H.; HONG, C. H.; BAHK, G. J.; CHOI, W. S. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* sp. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, p. 411 – 418, 2005.

LIU, W.; ZHU, X. N.; YU, S.; SHI, X. M. Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing, **Food Microbiology**, Londres, v. 28, n. 6, p. 1182-1189, 2011.

MAGALHÃES V. D.; FERREIRA, J. C.; BARELLI, C.; DARINI, A. L. C.; Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia uma revisão técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAJTÁNOVÁ, L.; MAJTÁN, V. Molecular characterization of the multidrug- resistant phage types *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104, DT20A and DT120 strains in the Slovakia. **Microbiological Research**, Jena, v. 164, p. 157—162, 2009.

MAJTANOVA, L.; MAJTAN, J.; MAJTAN, V. Trends in phage types of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated in Slovakia from 1995 to 2009. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, Nova Iorque, v. 69, n. 4, p. 454–456, 2011.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C.R. Métodos de Diagnóstico. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. Ed.Atheneu, 2008. Cap. 14, p. 117-125.

M'IKANATHA, N. M.; SANDT, C. H.; LOCALIO, A. R.; TEWARI, D.; RANKIN, S. C.; WHICHARD, J. M.; ALTEKRUSE, S. F.; LAUTENBACH, E.; FOLSTER, J. P.; RUSSO, A. Multidrug resistant *Salmonella* isolates from retail chicken meat compared with human clinical isolates. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 8, p. 929-934, 2010.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MOREIRA, G. N.; REZENDE, C. S. M.; CARVALHO, R. N.; MESQUITA, S. Q. P.; OLIVEIRA, A. N.; ARRUDA, M. L. T. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 126-130, 2008.

MÜRMAN, L.; SANTOS, M. C.; LONGARAY, S. M.; BOTH, J. M. C.; CARDOSO, M. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 39, p. 529-534, 2008.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, p. 1661–1669, 1999.

OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; SKOV, M. N.; CHRISTENSEN, J. P. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis applications in investigations of salmonellosis among livestock. **Veterinary Quarterly**, Holanda, v. 15, n. 4, p. 125-135, 1993.

PERRON, G. G.; QUESSY, S.; LETELIERG, A.; BELL, G. Genotypic diversity and antimicrobial resistance in asymptomatic *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **Infections, Genetic and Evolution**, Amsterdam, v. 7, p. 223–228, 2007.

POWER, E. G. M. RAPD typing in microbiology—a technical review. **Journal of Hospital Infection**, Londres, v. 34, p. 247–265, 1996.

SCHÜRCH, A. C.; SOOLINGEN, D. V. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: From phage typing to whole-genome sequencing. **Infections, Genetic and Evolution**, Amsterdam, v. 12, p. 602-609, 2012.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. *Salmonella*. In: **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. Cap. 19, p. 253-285.

SJÖLUND-KARLSSON, M.; HOWIE, R.; RICKERT, R.; KRUEGER, A.; TRAN, T. T.; ZHAO, S.; BALL, T.; HARO, J.; PECIC, G.; JOYCE, K.; FEDORKA-CREY, P. J.; WHICHARD, J. M.; MCDERMOTT, P. F. Plasmid-mediated Quinolone resistance among Non-Typhi *Salmonella enterica* isolates, USA. **Emerging Infection Diseases**, Atlanta, v. 16, n. 11, 2010.

STRUELENS, M. J.; DE RYCK, R.; DEPLANO, A. Analysis of Microbial Genomic Macrorestriction Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Typing. In: DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. J.; STRUELENS, M. **New approaches for the generation and analysis of microbial typing data**. Amsterdam: Elsevier, 2001. Cap. 7, p. 159-176.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial typing. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.33, n.9, p. 2233–2239, 1995.

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

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10.ed. Porto

Alegre:Artmed, 2012.

TOZETTO, S.M. **Sorotipos e tipagem molecular de isolados de Salmonella entérica no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004**. 2006. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

UENO, M.; JORGE, A. O. C. Caracterização de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, envolvidos em infecções nosocomiais, por meio de técnicas fenotípicas e análise de perfil plasmidial. **Revista Biociência**, Taubaté, v.7, n.2, p.15-22, jul/dez. 2001.

WARD, L. R.; DE SA, J. D. H.; ROWE, B. A phage-typing scheme for Salmonella enteritidis. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 99, p. 291-294, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Drug-resistance Salmonella [online], 2005. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso em: 02 de agosto de 2012.

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

YAN, S. S.; PENDRAK, M. L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, J. W.; FEDORKO, D. P.; FOLEY, S. L. An overview of Salmonella typing: Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, p. 189-204, 2003.

YANG, B.; QU, D.; ZHANG, X.; SHEN, J.; CUI, S.; SHI, Y.; XI, M.; SHENG, M.; ZHI, S.; MENG, J. Prevalence and characterization of Salmonella serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, p. 63-72, 2010.