

SÍLVIA MORSOLETTO TOZETTO

**SOROTIPOS E TIPAGEM MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Salmonella enterica*  
NO PARANÁ NO PERÍODO DE OUTUBRO DE 2002 A MAIO DE 2004**

Dissertação apresentada à  
Coordenação do Programa de Pós  
Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal do Paraná  
como requisito parcial à obtenção do  
grau de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cyntia Maria  
Telles Fadel-Picheth

CURITIBA

2006

*Não quero ser o grande rio caudaloso*

*Quero ser o cristalino fio d'água.*

Helena Kolody

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e por iluminar o meu caminho, colocando ao meu lado pessoas especiais, que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente e me impulsionaram para que eu conseguisse chegar até aqui.

Especialmente à Cyntia quero agradecer por tudo o que fez por mim e para a realização deste trabalho. Pelos conhecimentos compartilhados, confiança depositada, e pelo sorriso sempre presente, mesmo nos momentos mais difíceis.

À Sônia Farah agradeço pelo seu companheirismo, por compartilhar suas reflexões acerca da vida, e por disponibilizar as amostras.

Agradeço à Coordenação do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade e pela busca incessante de qualidade para o nosso curso. A todos os professores que contribuíram para a minha formação, em especial às professoras Tânia Bonfim e Gisele Bordignon, pela amizade.

À Direção do LACEN, pela ajuda com os dados e pelas amostras, sem as quais este trabalho não seria possível.

Às colegas do Laboratório de Bacteriologia Molecular: Caroline Pigatto, Celene Cândido, Cibelle Dallagassa, Daeska Koch, Larissa Comarella e Octaviana Fialho, pelos momentos de descontração e auxílio no dia-a-dia.

Quero fazer um agradecimento especial à minha família. Ao meu pai, Sérgio, por me ensinar os verdadeiros valores da vida: amor, trabalho e honestidade. À minha mãe, Delma, por me ensinar a ter fé e por me proteger sob o manto de Maria. À minha irmã, Carolina, pelo companheirismo e amizade. À minha nova família de Recife, que mesmo de longe me apoiou, em especial à D. Teresinha e Dr. Adalberto.

Ao Ricardo, agradeço de todo coração, pelo apoio incondicional, amor, paciência, e principalmente por estar sempre ao meu lado, compartilhando dos meus sonhos.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
<b>1.0 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1 NOMENCLATURA.....	3
2.2 INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>Salmonella</i> .....	6
2.2.1 Patogênese.....	8
2.3 TRANSMISSÃO.....	10
2.4 EPIDEMIOLOGIA DE <i>Salmonella</i> no BRASIL.....	12
2.5 TRATAMENTO.....	16
2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	18
2.7 MÉTODOS DE SUBTIPAGEM.....	20
<b>3.0 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
4.1 AMOSTRA.....	25
4.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	27
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL.....	27
4.4 QUANTIFICAÇÃO DE DNA.....	28
4.5 RAPD - PCR.....	28
4.6 SERE - PCR.....	29
4.7 DETECÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE RAPD E SERE.....	29
4.8 DENDROGRAMA.....	29
<b>5.0 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5.1 SOROTIPAGEM.....	32
5.2 RAPD – PCR .....	33
5.2.1 RAPD – PCR com o iniciador OPA - 4.....	34

5.2.2	RAPD – PCR com o iniciador 23L.....	36
5.2.3	RAPD – PCR com o iniciador P1254.....	39
5.2.4	RAPD – PCR com o iniciador OPB - 6.....	41
5.2.5	RAPD – PCR com o iniciador OPB - 15.....	43
5.2.6	RAPD – PCR com o iniciador OPB - 17.....	45
5.3	SERE-PCR.....	47
5.4	DENDROGRAMA.....	50
<b>6.0</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7.0</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Localização das Regionais de Saúde do Estado do Paraná e cidades onde ocorreram infecção causada por <i>Salmonella</i> analisadas neste estudo.....	31
Figura 2	Perfis de RAPD-PCR obtidos com iniciador OPA - 4 para sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> .....	34
Figura 3	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPA - 4 para <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	35
Figura 4	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador 23L para <i>Salmonella enterica</i> .....	36
Figura 5	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador 23L para <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	37
Figura 6	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador P1254 para <i>Salmonella enterica</i> .....	39
Figura 7	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador P1254 para <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	40
Figura 8	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 6 para <i>Salmonella enterica</i> .....	41
Figura 9	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 6 para <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	42
Figura 10	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 15 para <i>Salmonella enterica</i> .....	43
Figura 11	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 15 para <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	44
Figura 12	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 17 para <i>Salmonella enterica</i> .....	45
Figura 13	Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 17 para <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	46
Figura 14	Perfil de SERE – PCR obtido sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> .....	47

Figura 15	Perfil de SERE – PCR obtido sorotipos de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	48
Figura 16a	Dendrograma de 103 estirpes de <i>Salmonella enterica</i> construído a partir dos perfis de RAPD obtidos com seis iniciadores.....	51
Figura 16b	Dendrograma de 103 estirpes de <i>Salmonella enterica</i> construído a partir dos perfis de SERE.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Subespécies de <i>Salmonella</i> .....	5
Tabela 2	Sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> identificados pela FIOcruz de 2001 a 2005.....	15
Tabela 3	Pocentagens de estirpes resistentes a antimicrobianos analisadas na FIOcruz, de 2001 a 2005, por número de antimicrobianos.....	17
Tabela 4	Caracterização dos surtos por local data e número de amostras analisadas.....	26
Tabela 5	Iniciadores utilizados na análise por RAPD-PCR.....	28
Tabela 6	Número de surtos e casos esporádicos de infecção causada por <i>Salmonella</i> por cidade e Regional de Saúde.....	30
Tabela 7	Freqüência dos sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> isolados de amostras clínicas humanas no Estado do Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004.....	32
Tabela 8	Perfil de RAPD e SERE para <i>Salmonella</i> Enteritidis provenientes de surtos.....	49
Tabela 9	Perfil de RAPD e SERE para <i>Salmonella</i> Enteritidis provenientes de casos esporádicos.....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Agentes etiológicos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, no período de 1999 a 2004.....	14
Gráfico 2	Surto de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, de 1999 a 2004, segundo tipo alimento envolvido e respectiva frequência.....	16

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Center for Disease Control
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GN	Caldo para bactérias Gram negativas
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LACEN	Laboratório Central do Estado
NCCLS	National Committee for Clinical Standards
pb	pares de bases
PEEC	Pathogen Elicite Epithelial Chimioattractor
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ácido Ribonucleico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SERE	<i>Salmonella</i> Enteritidis Repeat Element
SPI - 1	Ilha de Patogenicidade 1 de <i>Salmonella</i>
SPI - 2	Ilha de Patogenicidade 2 de <i>Salmonella</i>
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris EDTA
TSB	caldo tripticase soja
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
WHO	World Health Organization
XLD	Ágar xilose lisina desoxicolato

## RESUMO

*Salmonella* são patógenos transmitidos por alimentos capazes de provocar infecções intestinais e extra-intestinais em humanos. Cento e duas estirpes de *Salmonella enterica* foram isoladas no Paraná durante o período de outubro de 2002 a maio de 2004, no qual foram notificados 22 surtos de doença gastrointestinal e 26 casos de infecção esporádica (2 meningites, 1 bacteremia, 1 infecção urinária e 22 gastroenterites) causados por essas bactérias. Doze sorotipos de *Salmonella enterica* foram identificados: *Salmonella* Enteritidis; *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Muenster, *Salmonella* Panamá, *Salmonella* Newport, *Salmonella* London, *Salmonella* Weltvreden, *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Javiana, *Salmonella* Derby e *Salmonella* 8,20:z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub>:- . *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo predominante, isolado de 91% dos surtos e de 61,5% dos casos esporádicos de infecção. *Salmonella* Livingstone e *Salmonella* Muenster foram responsáveis por 4,5% dos surtos de gastroenterite cada. *Salmonella* Panamá (4,2%) foi isolada em dois casos de infecção esporádica (1 gastroenterite e 1 bacteremia); os demais sorotipos apresentaram frequência de 2,1% e foram isolados de casos de infecção esporádica. Os resultados de RAPD-PCR classificaram as estirpes de *Salmonella enterica* em dois grupos distintos, um contendo as estirpes do sorotipo Enteritidis, e o outro os demais sorotipos analisados. As estirpes de *Salmonella* Enteritidis foram classificadas em 11 grupos. As estirpes isoladas de casos esporádicos de infecção apresentam maior variabilidade genética que aquelas isoladas de surtos. Um subtipo de *Salmonella* Enteritidis predominou no estado, sendo responsável por 16 dos 20 surtos e por 8 dos 16 casos esporádicos de infecção causados por este sorotipo. O ensaio de SERE-PCR gerou perfis distintos para os sorotipos de *Salmonella enterica* analisadas, mas não discriminou entre as estirpes de *Salmonella* Enteritidis nas condições de ensaio utilizadas. O ensaio de RAPD-PCR apresentou maior nível de discriminação que o SERE-PCR.

## ABSTRACT

*Salmonella* is a foodborne pathogen capable to cause intestinal and extra-intestinal infections in humans. One hundred and two strains of *Salmonella enterica* were isolated in Paraná State during the period of October 2002 to May 2004. During this period strains of *Salmonella enterica* were responsible for 22 foodborne outbreaks and 26 sporadic cases of infection (2 meningitis 1 bacteremia, 1 urinary tract infection and 22 gastroenteritis). Twelve serotypes of *Salmonella enterica* were identified: *Salmonella* Enteritidis; *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Muenster, *Salmonella* Panamá, *Salmonella* Newport, *Salmonella* London, *Salmonella* Weltvreden, *Salmonella* Saintpaul, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Javiana, *Salmonella* Derby, and *Salmonella* 8,20:z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub>:-. *Salmonella* Enteritidis was the predominant serotype, isolated from 91% of the outbreaks and of 61,5% of the sporadic cases of infection. *Salmonella* Livingstone and *Salmonella* Muenster were responsible for 4,5% of the gastroenteritis outbreaks each. *Salmonella* Panamá (4,2%) was isolated from 2 cases of sporadic infection (1 gastroenteritis and 1 bacteremia); the other serotypes presented frequency of 2,1% and were isolated from sporadic cases of infection. RAPD-PCR results classified *Salmonella enterica* strains in two groups, one containing *Salmonella* Enteritidis strains, and the second the other *Salmonella* serotypes analyzed. *Salmonella* Enteritidis strains were classified in 11 grupos. Genetic diversity was greater among strains isolated from sporadic cases of infection than those isolated from the outbreaks. One subtype of *Salmonella* Enteritidis was predominant, being responsible for 16 of the 20 outbreaks and for 8 of the 16 sporadic cases of infection caused by this serotype. Distinct patterns of SERE-PCR were observed for different serotypes of *Salmonella enterica* analyzed, however this assay did not distinguish among *Salmonella* Enteritidis strains under the assay conditions used. RAPD-PCR showed greater discriminatory power than SERE-PCR.

## 1 INTRODUÇÃO

*Salmonella* é uma das bactérias mais extensivamente estudadas em termos de fisiologia, genética e estrutura celular e também é uma das bactérias patogênicas melhor caracterizadas em termos de virulência (DARWIN e MILLER, 1999).

Bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos que compõem o grupo mais complexo das *Enterobacteriaceae*, com 2.541 sorotipos descritos (KONEMAN, 1997; CDC 2004).

Essas bactérias estão amplamente dispersas na natureza, podem ser encontradas no trato gastrointestinal de mamíferos, répteis, pássaros e insetos (MILLER et al., 1995; KONEMAN, 1997; HOFER et al., 1997; BAUDART et al., 2000; RABSCH et al., 2002).

Alguns sorotipos têm uma ampla faixa de hospedeiros e causam doença gastrointestinal e doença sistêmica, enquanto os sorotipos Typhi e Paratyphi A são restritos aos humanos e causam doença sistêmica (GILLIGAN et al., 1992; MILLER et al., 1995; BÄUMLER et al., 1998; RODRÍGUEZ et al., 1998; DUIJKEREN et al., 2002; RABSCH et al., 2002; VAAGLAND et al., 2004; BOUALLÈGUE-GODET et al., 2005; GUERIN et al., 2005).

*Salmonella* pode causar um amplo espectro de doenças em humanos variando de febre tifóide, bacteremia, gastroenterite e infecções focais. É uma das principais causas de gastroenterite veiculada por alimentos em todo o mundo, e um importante problema de saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento (GILLIGAN et al., 1992; MILLER et al., 1995; GUERRANT et al., 2001; PAYMENT e RILEY, 2002).

A transmissão de *Salmonella* aos humanos ocorre através da ingestão de alimentos ou água contaminados com células viáveis da bactéria. Os alimentos de origem animal, crus ou mal cozidos, principalmente carne de frango e em especial ovos, são os mais freqüentemente envolvidos (GALÁN, 2001; HUMPHREY, 2004).

A identificação e subtipagem dos microrganismos responsáveis por casos de diarreia são importantes ferramentas nos laboratórios de saúde pública. Podem auxiliar na identificação da fonte de contaminação, no controle de surtos e levar a uma redução nas taxas de transmissão (GUERRANT et al., 2001).

Bactérias do gênero *Salmonella* podem ser facilmente isoladas e identificadas em laboratórios clínicos utilizando técnicas microbiológicas convencionais (BOPP et al., 1999). Após a identificação da bactéria utilizando testes bioquímicos e sorológicos, o sorotipo deve ser determinado em laboratórios de referência. A sorotipagem de *Salmonella* é baseada em reações antígeno-anticorpo, para carboidratos da superfície celular, conhecidos como antígenos somáticos O, e proteínas flagelares denominadas antígenos flagelares ou H.

A sorotipagem de *Salmonella* é fundamental para a vigilância epidemiológica e investigação de surtos (CDC, 2004), mas métodos como perfil plasmidial, *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), técnicas baseadas em PCR e outras técnicas moleculares têm sido amplamente utilizados para a subtipagem de *Salmonella* (HOLMBERG et al., 1984; FADL et al., 1995; THONG et al., 1995; LIN et al., 1996; RAJASHEKARA et al., 1998; WRAY et al., 1998; BAUDART et al., 2000; GARAIZAR et al., 2000; LINDSTEDT et al., 2000; ALVAREZ et al., 2004; FAKHR et al., 2005; RASSCHAERT et al., 2005; ROSS et al., 2005).

Neste trabalho, estirpes de *Salmonella* isoladas de surtos e casos isolados de infecção em humanos foram analisadas quanto ao sorotipo e subtipadas utilizando métodos moleculares.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Bactérias do gênero *Salmonella* foram primeiramente descritas por Eberth, em 1880, e cultivadas por Gaffkey em 1884 (MILLER et al., 1995; DARWIN, MILLER, 1999). Posteriormente essas bactérias foram diferenciadas com base em reações antígeno - anticorpo, e por muitas décadas cada novo sorotipo recebia a designação de uma espécie, por exemplo: *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella pullorum* (DARWIN, MILLER, 1999).

As bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos. Pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e como outros membros desse grupo, fermentam glicose, reduzem nitratos a nitritos e não produzem citocromo oxidase (BOPP, 1999; FORBES, 2002; MACFADDIN, 2000). O gênero *Salmonella* engloba 2 espécies e 2541 sorotipos (POPPOF, 2001; CDC 2004).

### 2.1 NOMENCLATURA

A nomenclatura de *Salmonella* é complexa e diferentes sistemas têm sido utilizados para se referir às bactérias desse gênero. Entretanto a padronização da nomenclatura de *Salmonella* é necessária para a adequada comunicação entre microbiologistas, profissionais da área da saúde, órgãos oficiais de saúde e para o público em geral (BRENNER et al., 2000). Existem ainda vários problemas na nomenclatura do gênero *Salmonella*, como por exemplo o uso dos nomes *Salmonella choleraesuis* versus *Salmonella enterica*; o uso dos termos “sorotipo” e “sorovar”; a melhor forma de escrever os nomes dos sorotipos (FARMER III, 1999).

Até 1970 o conceito de espécie no gênero *Salmonella* era baseado na epidemiologia, faixa de hospedeiro, reações bioquímicas e estrutura antigênica. Estirpes que diferiam em uma ou mais dessas características recebiam nomes distintos (FARMER III, 1999; BRENNER et al., 2000). Historicamente os nomes das espécies atribuídos aos membros do gênero *Salmonella* foram designados arbitrariamente. Em alguns casos o nome foi correlacionado com a síndrome, como no caso de *S. typhi* causa da febre tifóide. Outros nomes foram correlacionados com a síndrome e especificidade do hospedeiro, e estava correta em alguns casos

como *Salmonella abortus-ovis* e *Salmonella abortus-equi*; e errada em outros, como *Salmonella typhi-murium* e *Salmonella cholerae-suis*. Para evitar confusão, nomes indicando a origem geográfica da primeira estirpe de um novo sorotipo foram adotados, como *Salmonella london*, *Salmonella panama*. Esses nomes, erroneamente considerados como espécies, eram escritos em itálico. Mas não refletiam uma classificação taxonômica. Em outras espécies, como por exemplo *Escherichia coli*, nomes não são atribuídos aos sorotipos, que são designados somente pela fórmula antigênica. Entretanto os nomes dos sorotipos de *Salmonella* mais frequentemente encontrados se tornaram tão familiares que se tornou praticamente impossível suprimi-los e substituí-los pela fórmula antigênica (POPOFF, 2001).

Na década de 70, estudos de hibridização de DNA demonstraram que as estirpes de *Salmonella* formam um único grupo de hibridização de DNA, com sete subgrupos (CROSA et al., 1973, EUZÉBY, 1999). Posteriormente, análises de eletroforese de enzimas multilocus confirmaram a existência de subgrupos consistentes com aqueles baseados em hibridização de DNA, com uma exceção, o que levou à criação da espécie *Salmonella bongori* (REEVES et al., 1989; BOYD et al., 1996).

O gênero *Salmonella* compreende as espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* é subdividida em 6 subespécies designadas por nomes ou números romanos.

Tabela 1. Subespécies de *Salmonella enterica*

I	<i>enterica</i>
II	<i>salamae</i>
IIIa	<i>arizonae</i>
IIIb	<i>diarizonae</i>
IV	<i>houtenae</i>
VI	<i>indica</i>

As subespécies IIIa e IIIb pertenciam anteriormente ao gênero *Arizonae*. *Salmonella bongori* foi originalmente designada como *S. enterica* subespécie V, e posteriormente considerada como uma espécie separada. Entretanto essas

estirpes são comumente referidas como “subespécie V” para o propósito de designação de sorotipo (POPOFF, 2001; CDC, 2004).

Estas espécies e subespécies podem ser distinguidas com base em características bioquímicas e genéticas. Nomes foram mantidos somente para os sorotipos mais freqüentes de *Salmonella enterica*. Esses nomes não devem ser indicados em itálico, e a primeira letra deve ser maiúscula. Na prática o nome da subespécie não precisa ser indicado, uma vez que somente os sorotipos da subespécie *enterica* têm nome. Assim, as designações: *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipo Typhimurium ou *Salmonella* Typhimurium podem ser usadas. Sorotipos de outras subespécies de *Salmonella enterica* e aqueles de *Salmonella bongori* são designados somente pelas suas fórmulas antigênicas (POPOFF, 2001; CDC 2004).

Uma terceira espécie, *Salmonella subterranea*, foi descrita recentemente isolada de sedimento coletado de região aquífera em Oak Ridge, EUA. A seqüência de DNA ribossomal mostrou que essa bactéria apresentou maior similaridade (96,4%) com *Salmonella bongori* (SHELOBOLINA et al., 2004).

## 2.2. INFECÇÕES CAUSADAS POR *Salmonella*

*Salmonella* pode causar estado de portador assintomático ou de doença em humanos. As manifestações clínicas causadas pela infecção por *Salmonella* incluem febre entérica, gastroenterite, bacteremia, endocardite e infecção vascular, infecções focais como artrite e osteomielite entre outras (GILLIGAN, 1992; THRELFALL et al., 1992; GUERRANT, 1995; MILLER, 1995; SCHELD e SANDE, 1995; LINDSAY, 1997; DARWIN e MILLER, 1999; BUTLER, 2000; KAYE, 2000; MAHON e MANUSELIS, 2000; VIDAL et al., 2003).

A febre entérica, ou a sua manifestação mais grave a febre tifóide, é uma doença sistêmica severa caracterizada por febre prolongada, dor abdominal, diarreia, esplenomegalia e podem surgir complicações como hemorragia e perfuração intestinal. O período de incubação varia de 5 a 28 dias, com sintomas inespecíficos, como dor abdominal e febre, que se agrava com a evolução da bacteremia. O prognóstico é a cura com a antibioticoterapia, mas também podem haver recaídas 7 a 14 dias após o término do tratamento. Essa doença foi quase

eliminada nos países desenvolvidos devido ao tratamento da água e esgoto, mas permanece comum nos países em desenvolvimento, onde a mortalidade é de 10%. Os agentes são as estirpes tifóides *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A (D'AOUST, 1991; MILLER et al., 1995; DARWIN e MILLER, 1999; BUTLER, 2000). A seqüência de nucleotídeos do genoma e a análise de microarranjo de DNA de *Salmonella* Typhi e Paratyphi A indica que ambas são similares e acumularam, independentemente, muitos pseudogenes entre as 4.400 seqüências codificadoras de proteínas: 173 no sorotipo Paratyphi A e 210 no sorotipo Typhi. Somente 30 genes estão degradados em ambos os sorotipos (MCCLELLAND et al., 2004).

A gastroenterite, com diarréia como principal sintoma, é a manifestação clínica mais freqüente da infecção causada por *Salmonella* não tifóide (DARWIN e MILLER, 1999; KAYE, 2000; MAHON e MANUSELIS, 2000). O período de incubação é de 8 a 72 horas. Os sintomas incluem dor abdominal, náusea e diarréia aquosa, raramente com muco e sangue. Leucócitos geralmente estão presentes. Outros sintomas tais como anorexia, vômito e dores de cabeça também podem ocorrer. Febre baixa de curta duração (menos de 48 horas) freqüentemente acompanha a gastroenterite. A diarréia geralmente é autolimitada, com redução gradativa dos sintomas em cerca de cinco dias, podendo se agravar em crianças, idosos e indivíduos imunodeprimidos (D'AOUST, 1991; MILLER et al., 1995).

Além de serem causa comum de gastroenterite, estirpes de *Salmonella* não tifóide também podem causar diversas infecções extra-intestinais graves (FIERER e GUINEY, 2001). Por exemplo as infecções causadas por *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Tiphimurium, geralmente são restritas ao trato gastrointestinal, entretanto *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Choleraesuis estão associadas com bacteremia (D'AOUST, 1991; OHL e MILLER, 2001).

Algumas pessoas desenvolvem bacteremia sem apresentar manifestações gastrointestinais. A bacteremia pode resultar em artrite, osteomielite ou outra infecção localizada.

O estado de portador intestinal assintomático, de duração variável, pode seguir infecção sintomática ou inaparente. A maioria dos portadores são portadores transitórios, durante 4-5 semanas. O estado de portador crônico, associado com a duração de mais de um ano, geralmente é permanente e está mais freqüentemente

relacionado com a infecção da vesícula biliar (MILLER et al., 1995; LINDSAY, 1997; KAYE, 2000).

Estudo de registros compreendendo pessoas com infecções gastrointestinais e controles normais, revelou que cerca de 2% das pessoas acometidas por doença causada por *Salmonella*, *Campylobacter* e *Yersinia enterocolitica* morreram em um período de um ano após a infecção comparada com 0,7% para os controles. Foi sugerido que infecções causadas por aquelas bactérias estão associadas com risco de mortalidade aumentado (HELMS et al., 2003; HUMPHREY, 2004).

### 2.2.1 Patogênese

As infecções causadas por *Salmonella* apresentam uma patogênese complexa. O primeiro passo no processo de doença é a transmissão da bactéria para um hospedeiro suscetível, no caso geralmente através de alimento contaminado. Foi estimado, em estudos com voluntários, que sejam necessárias  $10^5$  a  $10^{10}$  bactérias para iniciar uma infecção, mas a quantidade varia conforme a estirpe, o alimento consumido, e o estado geral do hospedeiro. Um inóculo grande é necessário para superar a barreira de acidez do estômago e competir com a microbiota do intestino. Mas a dose infecciosa é reduzida quando *Salmonella* é consumida com alimentos que atravessam o estômago rapidamente, como líquidos, ou com alimentos que neutralizam a acidez estomacal como queijo e leite. Indivíduos com pH gástrico mais elevado são mais suscetíveis à infecção (DARWIN e MILLER, 1999).

Para sobreviver no intestino, *Salmonella* também deve ser capaz de resistir aos efeitos da bile; este processo parece ser mediado por proteínas reguladas pelo sistema de 2 componentes PhoP-PhoQ (VENKINBURGH e GUNN, 1999). No intestino, os processos de aderência e invasão são fundamentais para o estabelecimento das infecções causadas por *Salmonella*. Antes de invadir qualquer tipo de célula as bactérias devem encontrar e aderir a um ou mais tipos de células encontradas no intestino. Em *Salmonella* Typhimurium esse tropismo pode envolver vários tipos de fímbrias, 4 das quais foram geneticamente definidas: fímbrias tipo 1 (Fim), fímbrias codificadas por plasmídeos (PE), *long polar fimbriae* (LP) e fímbrias finas agregativas (curli). Foi sugerido que cada fímbria apresenta

tropismo específico para certos tipos celulares e que desempenham uma função no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção (DARWIN e MILLER, 1999).

A maioria dos fatores de virulência de *Salmonella enterica* são determinados por genes cromossomais, muitos destes localizados dentro de ilhas de patogenicidade. As ilhas de patogenicidade são regiões grandes do cromossoma (10 a 200pb) que carregam um ou mais genes de virulência; estão presentes no genoma de bactérias patogênicas, mas ausentes do genoma de representantes não patogênicos da mesma espécie ou espécie intimamente relacionada e freqüentemente estão localizadas adjacentes a genes de tRNA (SCHMIDT e HENSEL, 2004).

As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPI) contribuem para a invasão de células e patogênese intracelular. Já foram descritas 12 SPI, algumas são conservadas no gênero *Salmonella* enquanto outras são específicas para determinados sorotipos (HENSEL, 2004).

Muitos patógenos entéricos invadem células de mamíferos promovendo rearranjo da actina, resultando na formação de pseudópodos que engolfam a bactéria. *Salmonella* spp também induz as células do hospedeiro a engolfá-las, mas este processo apresenta características peculiares. A adesão de *Salmonella* Typhimurium ou *Salmonella* Choleraesuis em culturas de células provoca uma alteração na superfície da célula hospedeira, promovendo um aspecto franzido ou pregueado “ruffling”, que resulta na internalização da bactéria no interior de uma vesícula endocítica. Esse processo é acompanhado por extensivo rearranjo da actina próximo ao local de invasão da bactéria. Após o engolfamento, a superfície celular e a organização da actina retornam ao normal. O processo de internalização é mediado por um grupo de genes designados *inv* que são altamente conservados em *Salmonella* (SALYERS; WHITT, 1994; DARWIN; MILLER, 1999).

Os genes necessários para o fenótipo de invasão estão agrupados em uma região definida do cromossoma denominada *Salmonella* Pathogenicity Island 1 (SPI-1), que está presente em *Salmonella bongori* e em todas as subespécies e sorotipos de *Salmonella enterica* já analisados. SPI-1 codifica um sistema de secreção tipo III que media a translocação de um conjunto complexo de proteínas efetoras para o interior das células eucarióticas. Um subgrupo das proteínas

efetoras media a invasão de células não-fagocíticas, um processo que resulta na reorganização temporal do citoesqueleto de actina da célula hospedeira (HENSEL, 2004; SCHMIDT e HENSEL, 2004).

A invasão da mucosa é necessária, mas não suficiente para o acúmulo de líquido para causar a diarreia. É possível que enterotoxinas sejam responsáveis ou contribuam para a diarreia associada com *Salmonella* (FASANO, 1997; DARWIN e MILLER, 1999). Outra possibilidade é que a interação de *Salmonella* com o epitélio resulta não somente na invasão das células epiteliais, mas também na produção de uma variedade de moléculas sinalizadoras nas células epiteliais. A produção de interleucina-8 (IL-8) e do quimioatratador epitelial induzido por patógeno (PEEC) pelas células epiteliais estimula a inflamação e a transmigração de leucócitos através do epitélio. A produção de prostaglandinas pelos leucócitos induz um aumento na atividade da adenilato ciclase nas células intestinais, inibindo a absorção do  $\text{Na}^+$ , o aumento na secreção do  $\text{Cl}^-$ , provoca a secreção de fluido que se manifesta como diarreia no hospedeiro (DARWIN e MILLER, 1999).

Outra característica importante de *Salmonella* é a capacidade de sobreviver no interior de fagócitos. Estudos realizados com *Salmonella* Typhimurium mostrara que esse é um processo complexo, requerendo o envolvimento de cerca de 200 genes que incluem aqueles que auxiliam a bactéria a sobreviver à exposição às formas reativas de oxigênio, baixo pH e defensas. A função da SPI-2 é essencial para a habilidade de *Salmonella* causar infecções sistêmicas e a proliferação nos órgãos do hospedeiro. Este fenótipo de virulência está ligado a habilidade de *Salmonella enterica* em sobreviver no interior de células fagocíticas e de se replicar dentro de vesículas que contém a bactéria em uma variedade de células eucarióticas (SCHMIDT e HENSEL, 2004).

Outras SPI estão associadas com a captação de ferro ou magnésio, síntese de fímbrias, genes de resistência a antimicrobianos ou com funções ainda não conhecidas (HENSEL, 2004).

## 2.3 TRANSMISSÃO

*Salmonella* Typhi e Paratyphi A colonizam somente humanos, razão pela qual a doença só é adquirida pela proximidade com uma pessoa que desenvolveu

febre entérica ou é um portador crônico. Geralmente envolve a aquisição da bactéria pela ingestão de água ou alimentos contaminados com fezes humanas, uma vez que a transmissão direta pessoa a pessoa é rara (MILLER et al., 1995; BUTLER, 2000).

*Salmonella* não-tifóide estão amplamente disseminadas na natureza e associadas com animais. Existe, em áreas geográficas específicas, uma correlação entre os sorotipos de *Salmonella* presentes nos animais e doença em humanos (MILLER et al., 1995). A infecção em humanos geralmente decorre da ingestão de água e alimentos contaminados. Como *Salmonella* apresenta a habilidade de persistir no intestino de animais e de invadir tecidos, muitos alimentos podem servir como veículos para transmissão de *Salmonella* o que representa um desafio maior à segurança alimentar (HUMPHREY, 2004; WIGLEY et al., 2005).

A maioria das infecções ocorre através da ingestão de alimentos de origem animal, principalmente ovos e derivados, carne de aves, crua ou mal cozida; em menor proporção leite e queijo não pasteurizados e carne bovina crua ou mal cozida contaminadas (GILLIGAN et al., 1992; EDWARDS, 2002; MILLER et al., 1995; KAYE, 2000). Os ovos geralmente são contaminados com fezes que penetram através de pequenas quebras. Entretanto a infecção do ovário de aves permite a incorporação de *Salmonella* diretamente no interior no ovo (KAYE, 2000). KELLER e colaboradores (1995) sugerem que enquanto os ovos em formação podem ser significativamente colonizados dentro do trato reprodutivo, fatores dentro do ovo controlam a bactéria antes que os mesmos sejam postos. A contaminação provavelmente decorre da infecção ascendente do ovo a partir da cloaca (KELLER et al., 1995).

*Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium são altamente invasivas em aves e podem contaminar o interior de ovos, *Salmonella* Choleraesuis está associada com porcos e *Salmonella* Dublin com gado (KAYE, 2000; HUMPREY, 2004).

A contaminação de carne bovina e ovina é menor de 1%. Outros alimentos como cereais e vegetais podem estar ocasionalmente contaminados com *Salmonella*, mas os níveis de prevalência são muito menores do que os encontrados em carnes (KAYE, 2000; HUMPREY, 2004).

*Salmonella* pode sobreviver a temperaturas de cozimento relativamente baixas no centro de ovos, carnes recheadas ou mal passadas. A falta de boas práticas na manipulação dos alimentos contribui para a disseminação dessas bactérias no ambiente de preparo dos alimentos. *Salmonella* tem a capacidade de aderir a superfícies como teflon, aço, vidro e fórmica, formando biofilmes (AUSTIN, 1998). A contaminação do alimento também pode ocorrer após o cozimento, através de contaminação cruzada via utensílios de cozinha ou mãos contaminadas. A multiplicação das bactérias pode então ocorrer se o alimento não for refrigerado (KAKU et al., 1995; KAYE, 2000).

É improvável que *Salmonella* seja erradicada da cadeia alimentar, mas pesquisas sobre a resposta da bactéria a diferentes condições ambientais podem levar à melhorias nas estratégias de intervenção para os produtores de alimentos e consumidores (HUMPHREY, 2004). Recentemente a seqüência completa do genoma de alguns sorotipos de *Salmonella enterica* foi publicada (MCCLELLAND et al., 2001 e 2004; PARKHILL et al., 2001; DENG et al., 2003; CHIU et al., 2005), o que pode permitir investigações detalhadas do comportamento da bactéria facilitando a identificação de produtos de genes importantes e as suas interações (HUMPHREY, 2004).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA DE *Salmonella* NO BRASIL

*Salmonella* não-tifóide é uma das principais causas de doença diarreica em humanos, e um desafio global a saúde pública (BARROW, 1993; OLSEN et al., 2001; HERIKSTAD et al., 2002; NADVORNY et al., 2004; WEINBERGER e KELLER, 2005). A incidência mundial de *Salmonella* não-tifóide tem se elevado desde a década de 70. Entre os sorotipos capazes de infectar humanos somente uns poucos são responsáveis pela maioria dos casos de doença. Os sorotipos que se tornaram predominantes na maioria das regiões geográficas são *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium (HERIKSTAD et al., 2002; CDC, 2004; WEINBERGER e KELLER, 2005).

Em países em desenvolvimento como o Brasil, as doenças diarreicas assumem maior importância, dentre outros fatores, pelo consumo de água não tratada, falta de saneamento básico, desnutrição e conseqüente agravamento dos

sintomas, principalmente em crianças, e a dificuldade de acesso ao diagnóstico e tratamento.

No Brasil o sistema de notificação de doenças transmitidas por alimento ainda é incipiente, e os números reais de casos de infecção por *Salmonella* são desconhecidos (KAKU et al., 1995; JAKABI et al., 1999).

De 1970 até o início de 1990 *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Agona foram os sorotipos mais freqüentemente isolados de fontes humanas em São Paulo (SILVA e DUARTE, 2002).

Em 1981 foi descrito, em Curitiba, Paraná, o primeiro surto de infecção causado por *Salmonella* Enteritidis (KAKU et al., 1995).

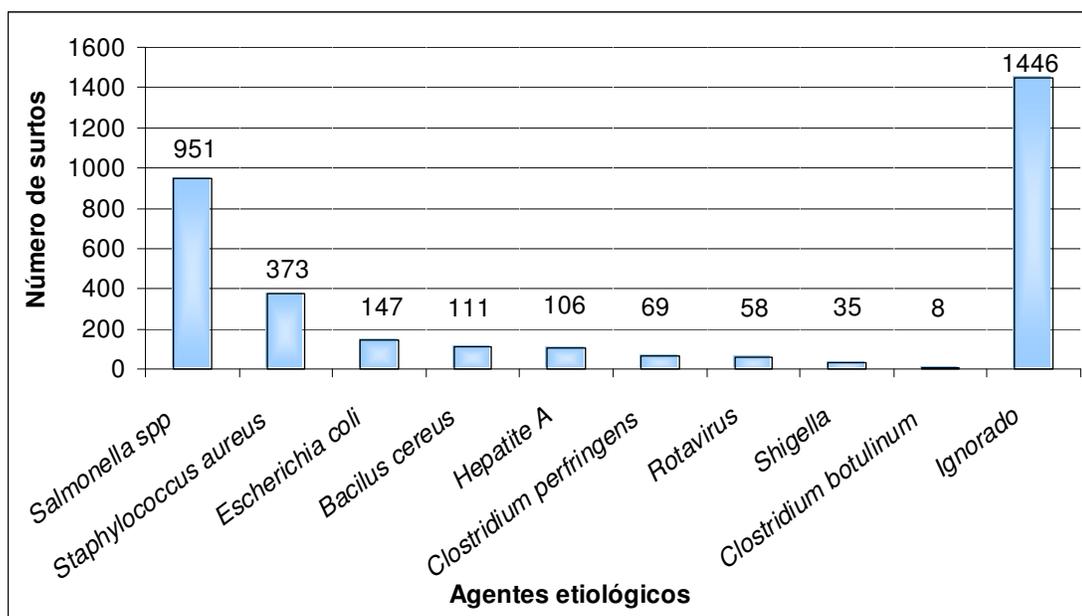
Até o início de 1990 *Salmonella* Enteritidis era apenas mais uma *Salmonella* raramente encontrada em amostras humanas. Em 1993 respondeu por cerca de 10% dos sorotipos de *Salmonella* isoladas de amostras humanas e a partir de então passou a predominar tanto em fontes humanas como não-humanas. Em 1994 e 1995 *Salmonella* Enteritidis correspondeu respectivamente, a 43% e 65% dos sorotipos de *Salmonella* isolados de humanos em São Paulo (TAUNAY, 1996).

A entrada de *Salmonella* Enteritidis no Brasil provavelmente ocorreu no final da década de 80, através da importação de matrizes contaminadas (IRINO, 1996).

De 1996 a 1999, segundo dados da Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, *Salmonella* foi o principal agente etiológico de infecções transmitidas por alimentos, responsável por 75% dos surtos (NADVORNY et al., 2004).

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgados no *Global Salmonella Surveillance* no Rio de Janeiro em setembro de 2005 (RODRIGUES, 2005), entre os agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos caracterizados no período de 1999 a 2004, no Brasil, *Salmonella* é o prevalente, conforme indicado no Gráfico 1.

Gráfico 1. Agentes etiológicos em surtos de Doenças Transmitidas por alimentos no Brasil no período de 1999 a 2004.



Fonte: RODRIGUES, 2005.

Os sorotipos de *Salmonella* identificados no Brasil no período de 2001 a agosto de 2005, segundo dados da ANVISA divulgados no *Global Salmonella Surveillance* no Rio de Janeiro em setembro de 2005, estão listados na Tabela 2, e mostram o predomínio de *Salmonella* Enteritidis.

Tabela 2. Sorotipos de *Salmonella enterica* identificados pela FIOcruz, de 2001 a 2005\*.

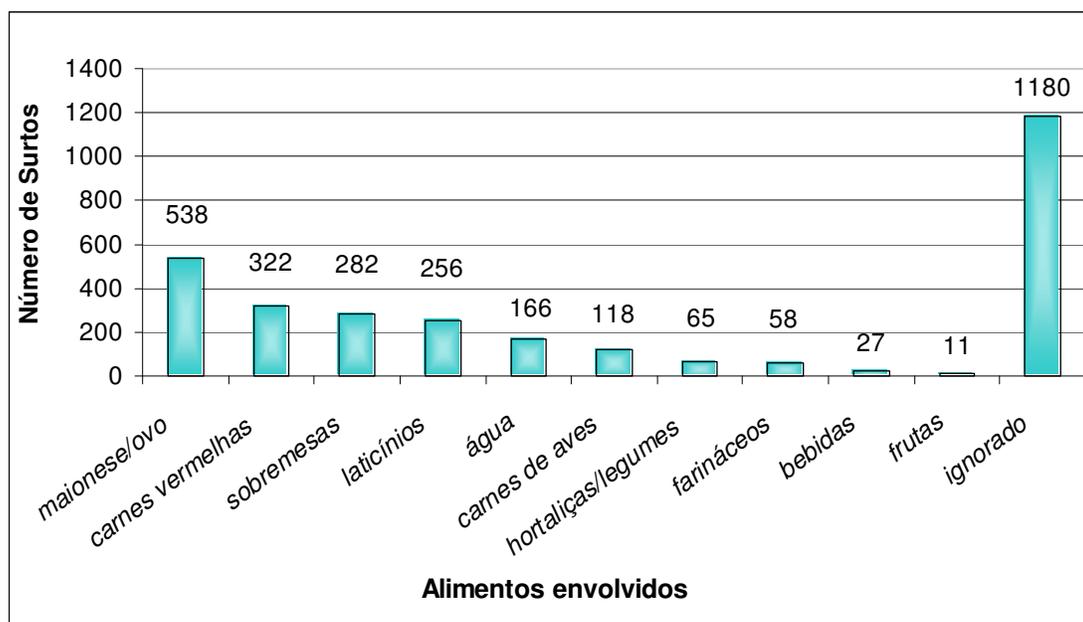
<b>Sorotipos</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005*</b>
<i>Salmonella</i> Agona	236	166	181	463	332
<i>Salmonella</i> Anatum	133	96	91	168	106
<i>Salmonella</i> Enteritidis	3.123	2.255	3.327	4.290	1.438
<i>Salmonella</i> Hadar	249	231	124	110	138
<i>Salmonella</i> Heidelberg	502	547	474	355	87
<i>Salmonella</i> Infantis	128	269	244	169	195
<i>Salmonella</i> Mbandaka	238	392	513	546	290
<i>Salmonella</i> Panama	392	905	682	510	341
<i>Salmonella</i> Senftenberg	301	243	294	644	216
<i>Salmonella</i> Typhimurium	480	379	439	996	609
Outros sorotipos	2.379	3.800	4.310	6.322	---

\*Janeiro a agosto de 2005.

Fonte: RODRIGUES, 2005

No Gráfico 2 estão indicados os alimentos responsáveis por surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil de 1999 a 2004, divulgados no *Global Salmonella Surveillance* no Rio de Janeiro em setembro de 2005.

Gráfico 2. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil, de 1999 a 2004, segundo o alimento envolvido e respectiva frequência.



Fonte: RODRIGUES, 2005

Os ovos e a maionese caseira são os principais responsáveis pelos surtos de infecção em humanos

## 2.6 TRATAMENTO

A abordagem primária para o tratamento da gastroenterite causada por *Salmonella* é a restituição de fluidos e eletrólitos. Drogas com efeito anti-peristáltico podem aliviar as cólicas, mas podem prolongar a diarreia.

O tratamento com antimicrobianos nas infecções autolimitadas causadas por *Salmonella* é contra indicado, pois essas drogas parecem não ter efeito sobre o curso clínico e há evidências de que aumenta o período de estado de portador. Portanto somente crianças, idosos ou pessoas com doenças subjacentes graves podem ser beneficiados com a terapia antimicrobiana. Entretanto, o tratamento se faz necessário em casos de infecções sistêmicas (D'AOUST, 1991; BUTLER, 2000; KAYE, 2000).

Dados internacionais têm indicado que isolados de *Salmonella* não-tifóide têm apresentado um aumento na resistência aos antimicrobianos (CDC, 2004; BOUALLÈGUE-GODET et al., 2005; WEINBERGER e KELLER et al., 2005).

Estudos realizados em São Paulo constataram que a maioria das estirpes isoladas no país até 2001 eram sensíveis às drogas testadas (CASTRO, 2002). Entretanto dados da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, divulgados no *Global Salmonella Surveillance*, demonstram que entre 2001 e 2005 houve um aumento na resistência, a pelo menos 1 ou 2 drogas antimicrobianas, por *Salmonella*, analisadas naquela instituição, conforme indicado na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagens de estirpes resistentes a antimicrobianos analisadas na Fundação Instituto Oswaldo Cruz, de 2001 a 2005, por número de antimicrobianos.

<b>Número de antimicrobianos</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005*</b>
1	13,9%	28,7%	27,3%	31,7%	24,4%
2	7,6%	32,6%	14,7%	30,3%	28,3%
3	4,4%	9,1%	5,8%	9,2%	8,2%
4	2,0%	9,1%	3,5%	5,1%	4,6%
>=5	0,7%	3,6%	2,5%	5,1%	4,0%
<b>Total estirpes analisadas</b>	<b>1.948</b>	<b>1.721</b>	<b>1.883</b>	<b>1.985</b>	<b>1.903</b>

\*Janeiro a agosto de 2005.

Fonte: RODRIGUES, 2005.

Há preocupação mundial quanto ao impacto adverso sobre a saúde pública, resultante do desenvolvimento de resistência bacteriana às drogas. O uso indiscriminado de antimicrobianos na ração animal é uma das causas do aumento da resistência bacteriana às drogas, pois pode selecionar estirpes resistentes (KELLEY, 1998).

## 2.6 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

Existem diversos meios de cultivo adequados para o isolamento de *Salmonella* nos laboratórios (DUSCH e ALTWEGG, 1995; BOPP et al., 1999). Para o isolamento de *Salmonella* a partir de amostras fecais geralmente são utilizados meios diferenciais, de baixa a elevada seletividade. Meios de cultivo de baixa seletividade incluem o agar MacConkey, o Eosina Azul de Metileno (EMB) e o agar Teague. Meios de seletividade intermediária incluem Hektoen, XLD e SS, e meios altamente seletivos incluem ágar sulfito bismuto e ágar verde brilhante. Caldos de enriquecimento para *Salmonella* também são frequentemente utilizados, entre eles o caldo tetrionato, o caldo selenito e o caldo GN (Gram negativo) (BOPP, 1999; OPLUSTIL et al., 2000).

Colônias com aspecto compatível com *Salmonella* são inoculadas em sistemas de triagem como KIA, TSI, Rugai ou EPM-MILi. Isolados suspeitos de serem *Salmonella* devem ser testados por aglutinação em lâmina com antisoros específicos para antígenos-O de *Salmonella* grupos A, B, C1, C2, D, E que são os mais frequentes; e identificados bioquimicamente. As estirpes devem ser enviadas para laboratório de referência para sorotipagem completa (BOPP, 1999; OPPLUSTIL et al., 2000).

Os sorotipos de *Salmonella* são definidos de acordo com a sua estrutura antigênica. O antígeno somático O é um carboidrato, componente mais externo do lipopolissacarídeo da membrana externa. É um polímero de subunidades O; cada subunidade é composta tipicamente de 4 a 6 açúcares dependendo do antígeno. Variações no antígeno O resultam da variação nos componentes açúcar da subunidade O, nos tipos de ligação covalente entre os açúcares da subunidade, e nos tipos da ligação entre as subunidades O que formam o polímero antígeno O (CDC, 2004).

Os antígenos O são designados por números e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella*. Estes são designados pelo fator O primário associado ao grupo. Muitos dos grupos O foram originalmente designados por letras e ainda são referidos assim, por exemplo *Salmonella* Typhimurium pertence ao Grupo O:4 ou Grupo B; *Salmonella* Enteritidis pertence ao Grupo O:9 ou Grupo D1. Fatores O adicionais estão associados com alguns grupos e são expressos variavelmente.

Quando múltiplos fatores O estão presentes, eles são listados em seqüência e separados por vírgulas (CDC, 2004).

O antígeno H é a porção filamentosa do flagelo bacteriano. É constituído por subunidades de flagelina, cuja porção antigenicamente variável é a região central da proteína. *Salmonella* pode expressar dois antígenos H diferentes, codificados por 2 genes distintos. A expressão desses genes é coordenada de modo que somente um antígeno flagelar é expresso num dado momento na célula bacteriana. Estes antígenos flagelares distintos são referidos como Fase 1 e Fase 2. Isolados monofásicos expressam somente um tipo de flagelina, o que ocorre naturalmente em alguns sorotipos (CDC, 2004).

A fórmula antigênica designa um sorotipo que compreende a subespécie, antígenos O, antígeno H fase 1, antígeno H fase 2. Por exemplo: I 4,12:i:1,2 (*Salmonella* Typhimurium); I 9,12:g,m:- (*Salmonella* Enteritidis); II 47:b:1,5; IV 48:g,z<sub>51</sub>:- (CDC, 2004).

O antígeno Vi, um antígeno capsular termolábil, é comumente encontrado em *Salmonella* Typhi e é útil para a identificação desse sorotipo. Também pode ser ocasionalmente detectado em *Salmonella* Dublin e *Salmonella* Paratyphi C. O antígeno Vi é identificado por aglutinação em lâmina com um anti soro específico (BOPP, 1999).

## 2.7 MÉTODOS DE SUBTIPAGEM

O conceito de relação clonal entre isolados de um mesmo surto é importante na epidemiologia das doenças infecciosas. Muitos surtos de infecção resultam da exposição a uma fonte comum do agente etiológico. Em geral esses microrganismos infecciosos são clonais, ou seja: são progênie de uma única célula e são geneticamente idênticos ou quase.

Subtipagem é a análise de um grupo de isolados bacterianos para várias características que permitam a discriminação abaixo do nível de espécie (SWAMINATHAN e MATAR, 1993).

As técnicas clássicas de tipagem como a biotipagem, determinação do padrão de suscetibilidade a antimicrobianos, sorotipagem e fagotipagem, baseiam-se na presença ou ausência de atividades metabólicas ou biológicas expressas pelos microrganismos (ARBEIT, 1995; FARBER, 1996). Embora esses métodos fenotípicos sejam valiosos para a caracterização de estirpes e ainda sejam utilizados, eles apresentam vários problemas. Por exemplo, cada organismo requer o uso de um conjunto adequado de reagentes e procedimentos. A sorotipagem e a fagotipagem requerem reagentes especializados como anti-soros, fagos e estirpes bacterianas para propagar os fagos, disponíveis somente em laboratórios de referência. Alguns isolados bacterianos podem ser não-tipáveis pela sorotipagem ou fagotipagem (SWAMINATHAN e MATAR, 1993). Os sistemas de fagotipagem e bacteriocinatipagem não são disponíveis para todas as espécies bacterianas. Além disso, os marcadores fenotípicos podem não ser expressos de forma estável em certas condições ambientais ou de cultivo (FARBER, 1996).

Com a disseminação dos métodos para análise de DNA, técnicas genotípicas têm sido aplicadas à tipagem de estirpes bacterianas (ARBEIT, 1999). Esses métodos de tipagem moleculares apresentam muitas vantagens sobre as técnicas convencionais. Uma das mais importantes é que como o DNA sempre pode ser extraído das bactérias, todas as bactérias são tipáveis; outra é que o poder discriminatório dos métodos baseados em análise de DNA é maior que o dos procedimentos fenotípicos (FARBER, 1996). Entretanto nenhuma abordagem molecular combina reprodutibilidade e poder discriminatório com rapidez e simplicidade (FARBER, 1996; TENOVER et al., 1997; ARBEIT, 1999).

O perfil plasmidial apresenta limitação inerente ao fato de que plasmídeos são elementos extra-cromossomais e não são parte do genótipo cromossomal que define a estirpe hospedeira. Plasmídeos podem ser espontaneamente perdidos ou prontamente adquiridos, conseqüentemente isolados epidemiologicamente relacionados podem apresentar perfis plasmidiais diferentes (ARBEIT, 1999).

A análise do padrão de bandas obtido após a digestão de DNA cromossomal com endonucleases de restrição, é outro método de tipagem molecular. Estirpes diferentes da mesma espécie bacteriana têm perfis distintos devido a variações nas seqüências de DNA que alteram o número e a distribuição dos sítios de restrição. Todos os isolados são tipáveis, mas a utilidade dessa técnica é limitada pela dificuldade em comparar perfis complexos que consistem de centenas de bandas que podem não ser resolvidas ou estar sobrepostas (TENOVER, 1997; ARBEIT, 1999).

A eletroforese em campo pulsado (Pulsed-field gel electrophoresis, PFGE) é uma técnica altamente efetiva para muitas espécies bacterianas. O genoma é digerido com uma enzima de restrição para a qual contém poucos sítios de reconhecimento, gerando cerca de 10 a 30 fragmentos de 10 a 800 pb. Esses fragmentos podem ser resolvidos como um padrão de bandas distinto usando uma cuba especialmente projetada que posiciona o gel de agarose entre 3 conjuntos de eletrodos que formam um hexágono ao redor do gel. O campo elétrico é fornecido em pulsos que se alternam a partir de cada conjunto de eletrodos, permitindo um alto nível de resolução. Todas as espécies são tipáveis por PFGE. É uma das técnicas mais reprodutíveis e discriminatórias, e atualmente é o método de escolha para a tipagem de muitas espécies (FARBER, 1996; TENOVER et al., 1997; ARBEIT, 1999).

Entre os métodos de tipagem baseados na reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) destacam-se a REP-PCR e a Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR). A primeira utiliza iniciadores baseados em seqüências cromossomais curtas repetitivas já identificadas para muitas bactérias; é reprodutível e tem poder discriminatório moderado (FARBER, 1996; ARBEIT, 1999).

A Random amplified polymorphic DNA (RAPD-PCR), também referida como Arbitrarily Primed-PCR (AP-PCR), é um método simples e rápido e tem várias

vantagens (WILLIAMS et al., 1990; WELSH et al., 1990; ARBEIT, 1999). A RAPD difere da PCR convencional em 2 pontos essenciais: 1. os iniciadores utilizados são curtos, geralmente 10 pb, e as seqüências são escolhidas aleatoriamente. Assim, não é necessário conhecer a seqüência de DNA alvo. Como o iniciador é um oligonucleotídeo curto, teoricamente haverá muitos sítios complementares a ele espalhados pelo genoma; e 2. a temperatura de anelamento para a RAPD é menor que na PCR convencional. As condições de reação são de baixa estringência para facilitar o início das reações de amplificação nos sítios onde há um ou mais pareamentos incorretos (FARBER, 1996; ARBEIT, 1999). Assim, um único iniciador com nenhuma homologia conhecida para um genoma pode anelar em regiões onde o pareamento é imperfeito. Quando 2 sítios de anelamento imperfeitos mas adequados ocorrem dentro de 200 a 2000pb um do outro, e em orientação correta nas fitas opostas de DNA, a seqüência entre os sítios será amplificada. O número e localização desses sítios aleatórios variam entre as diferentes estirpes, assim como o número e tamanho dos fragmentos detectados por eletroforese (FARBER, 1996; ARBEIT, 1999).

A fonte real de diferenças de bandas ou polimorfismos entre diferentes estirpes pode ocorrer como resultado de deleção de um sítio de anelamento; a inserção de DNA que move os sítios para regiões mais distantes; inserções ou deleções de DNA que alteram o tamanho de um segmento de DNA sem evitar a sua amplificação.

Embora existam muitas vantagens na tipagem pelo RAPD, a maior preocupação é em relação a reprodutibilidade. Alguns dos fatores que podem causar variação no perfil de RAPD incluem a concentração de  $Mg^{2+}$  e concentração e fonte da Taq DNA polimerase, método de extração de DNA, variação entre lotes de iniciadores, proporção na concentração entre DNA molde e iniciador, e o modelo do termociclador usado. Um fator adicional é a amplificação de fragmentos codificados por fagos ou plasmídeos, que podem ser adquiridos ou perdidos de forma imprevisível (FARBER, 1996; TYLER et al., 1997; SAUNDERS et al., 2001).

O método pode ser reprodutível sob condições cuidadosamente controladas. O uso de concentrações definidas de DNA purificado aumenta a reprodutibilidade do método assim como o poder discriminatório é aumentado pela realização de múltiplas amplificações com iniciadores diferentes (ARBEIT, 1999).

Para sorotipos comuns como *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhi, vários métodos de subtipagem além da sorotipagem são frequentemente utilizados. Métodos fenotípicos como a fagotipagem, determinação do padrão de susceptibilidades a antimicrobianos e biotipagem têm sido usados para subtipar estirpes de *Salmonella*. Mais recentemente métodos de genotipagem como perfil plasmidial, PFGE e RAPD-PCR foram aplicados à subtipagem dos sorotipos de *Salmonella* (BOPP, 1999).

A tipagem de *Salmonella* Enteritidis pelo SERE (*Salmonella* Enteritidis Repeat Element) foi descrita em 1998 (RAJASHEKARA, 1998). SERE é uma seqüência de oligonucleotídeos localizada na região promotora do operon *sefABCD* do genoma de *Salmonella* Enteritidis. Esta seqüência também aparece repetidas vezes no DNA cromossomal de *Salmonella* Enteritidis e em outros sorotipos de *Salmonella* e com grande similaridade em outras espécies de bactérias (RAJASHEKARA, 1998).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar quais são os sorotipos de *Salmonella enterica* isolados de casos de infecções em humanos no Estado do Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004 e fazer a subtipagem por métodos moleculares dessas estirpes.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a frequência dos sorotipos de *Salmonella enterica*.

Verificar a distribuição das estirpes de *Salmonella enterica* através da técnica *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR).

Analisar as estirpes de *Salmonella enterica* através da técnica de *Salmonella Enteritidis Repeat Element* (SERE).

Comparar os métodos de RAPD e SERE para a subtipagem das estirpes de *Salmonella enterica*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA

Foram analisadas 102 estirpes de *Salmonella enterica* isoladas de amostras clínicas humanas durante o período de outubro de 2002 a maio de 2004. As bactérias foram isoladas e identificadas no Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), e sorotipadas no Instituto Adolfo Lutz (IAL) em São Paulo.

Das 102 estirpes de *Salmonella enterica* analisadas neste trabalho, 76 são provenientes de 22 surtos de doença gastrointestinal e 26 foram isoladas de casos esporádicos de doenças incluindo: gastroenterite (22 casos), meningite (2 casos), bacteremia (1 caso) e infecção urinária (1 caso). Informações sobre os surtos estão apresentadas a seguir, na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização dos surtos segundo local, data de ocorrência e número de estripes analisadas\*.

<b>Surto</b>	<b>Local</b>	<b>Data</b>	<b>N° estripes isoladas de 10% dos envolvidos em surtos</b>
I	Enéas Marques	16/10/2002	2
II	Cornélio Procópio	31/10/2002	5
III	Lapa	05/11/2002	2
IV	Vera Cruz do Oeste	30/01/2003	5
V	Lapa	24/02/2003	4
VI	Curitiba	25/02/2003	3
VII	Nova Cantu	04/03/2003	2
VIII	Campo Mourão	30/05/2003	3
IX	Curitiba	16/09/2003	3
X	Pranchita	26/09/2003	2
XI	Curitiba	23/10/2003	2
XII	São José dos Pinhais	28/10/2003	2
XIII	Paranaguá	30/10/2003	2
XIV	Paranaguá	26/03/2004	2
XV	Curitiba	06/04/2004	2
XVI	Curitiba	04/05/2004	2
XVII	Francisco Beltrão	05/05/2004	4
XVIII	Campo Largo	06/05/2004	2
XIX	Curitiba	18/05/2004	9
XX	Colombo	24/05/2004	5
XXI	Curitiba	15/09/2004	6
XXII	Curitiba	24/09/2004	7

\*Conforme normatização da Secretaria de Vigilância do Estado do Paraná, amostras clínicas de 10% das pessoas envolvidas em surtos são enviadas para análise no LACEN.

## 4.2. CONDIÇÕES DE CULTIVO

As estirpes de *Salmonella enterica* foram cultivadas em ágar MacConkey (Merck) incubado por 18 a 24 horas a  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  sob aerobiose. Foram preparados estoques das bactérias em Tryptic Soy Broth (TSB) contendo 20% de glicerol e em Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco) mantidos respectivamente a  $-20^{\circ}\text{C}$  e a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## 4.3. EXTRAÇÃO DE DNA CROMOSSOMAL

A extração de DNA cromossomal foi realizada conforme SAMBROOK et al. (1989). Colônias de *Salmonella* foram suspensas em 1 mL de tampão  $\text{Tris}_{50\text{mM}}$   $\text{EDTA}_{20\text{mM}}$   $\text{NaCl}_{200\text{mM}}$  e centrifugadas a 14.000 rpm durante 2 minutos em centrífuga Eppendorf modelo 5410. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 450uL de  $\text{Tris}_{50\text{mM}}$   $\text{EDTA}_{20\text{mM}}$   $\text{NaCl}_{200\text{mM}}$ . Foram adicionados 5uL de lisozima (20mg/mL) à suspensão que foi então incubada a temperatura ambiente por 5 a 10 minutos. Após este período, foram adicionados 5uL de proteinase K (120mg/mL) à mistura que foi então incubada por 12 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . A seguir foi adicionado 100uL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), a mistura foi homogeneizada suavemente por inversão e centrifugada a 14.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e foram adicionados 100uL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1). A mistura foi homogeneizada por inversão e centrifugada a 14.000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e foram acrescentados 5uL de RNase (20mg/dL). A mistura foi incubada durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$ . O DNA foi então precipitado com 1,5 V de isopropanol e centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e 1mL de etanol 80% foi adicionado ao tubo que foi centrifugado a 14.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o DNA foi seco em estufa bacteriológica a  $37^{\circ}\text{C}$  e ressuspenso em 200uL de  $\text{Tris}_{10\text{mM}}$   $\text{EDTA}_{1\text{mM}}$ . As amostras de DNA foram mantidas sob temperatura de  $2^{\circ}\text{C}$  a  $8^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.4. QUANTIFICAÇÃO DE DNA

A estimativa da quantidade de DNA foi feita após eletroforese em gel de agarose e corada com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. A intensidade de fluorescência emitida sob luz ultra-violeta pelo DNA da amostra foi comparada com a emitida pelo Lambda DNA/HindIII Marker, Fermentas® (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.5. RAPD-PCR

As reações de RAPD-PCR foram realizadas com 6 iniciadores individualmente. Os iniciadores foram descritos por LIN et al (1996) e as seqüências estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Iniciadores utilizados na análise por RAPD-PCR.

<b>Iniciadores</b>	<b>Seqüência*</b>
23L	5' - CCGAAGCTGC - 3'
OPB-17	5' - AGGGAACGAG - 3'
OPA-4	5' - AATCGGGCTG - 3'
OPB-6	5' - TGCTCTGCCC - 3'
P1254	5' - CCGCAGCCAA - 3'
OPB-15	5' - GGAGGGTGTT - 3'

As reações foram realizadas com o sistema Super Mix (Invitrogen), que contém: Tris 20 mM, KCl 49,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 198 µM, Taq DNA polimerase 1U. As reações de RAPD foram realizadas em volume final de 23µL, contendo 20 µl de Super Mix, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,1 µl de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1 µl de DNA (~50ng); 1 µl de iniciador. A concentração utilizada para os iniciadores foi de 50 pmol para OPB-6, OPB-17, P1254, OPB-15; 30 pmol para 23L e 25 pmol para OPA-4.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf Gradient empregando o seguinte programa: 1 ciclo de 94°C durante 4 minutos; seguido de 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 35°C durante 1 minuto, 72°C durante 2

minutos; e um ciclo final de 72°C durante 5 minutos. Para cada estirpe as análises foram realizadas 3 vezes, em dias distintos.

#### 4.6. SERE-PCR

Para a reação do SERE, descrito por Rajashekara (1998), foi utilizado o iniciador 5' - GTGAGTATATTAGCATCCGCA -3'. As reações foram realizadas com o sistema Super Mix (Invitrogen), que contém: Tris 20 mM, KCl 49,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, dNTP 198 uM, Taq DNA polimerase 1U. As reações de SERE foram realizadas em volume final de 23uL, contendo 20 µl de Super Mix, 1 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,1 µl de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1 µl de DNA (~50ng); 1 µl de iniciador (30 pmol/µl).

As reações de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf Matercycler Gradient utilizando o seguinte programa: 1ciclo de 94°C por 4 minutos; 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos; seguidos de um ciclo final de 72°C por 10 minutos. Para cada estirpe as análises foram realizadas 3 vezes, em dias distintos.

#### 4.7. DETECÇÃO DOS PRODUTOS DAS REAÇÕES DE RAPD E SERE.

Os produtos das reações de RAPD e SERE foram detectados através de eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5%, a 30V durante 3 horas. Os géis foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) por 20 minutos, visualizados em transiluminador UV e fotografados (SAMBROOK et al., 1989).

#### 4.2. DENDROGRAMA

Os dendrogramas foram construídos empregando o *software* NTSYSpc 2.0 (ROHLF, 1998), utilizando os resultados obtidos através das técnicas de RAPD e SERE.

## 5 RESULTADOS

No período de outubro de 2002 a maio de 2004, estirpes de *Salmonella enterica* foram isoladas a partir de amostras clínicas enviadas ao LACEN por 16 municípios do Estado do Paraná. O número de surtos e casos isolados de doença em humanos causados por *Salmonella enterica* neste período está descrito na Tabela 6.

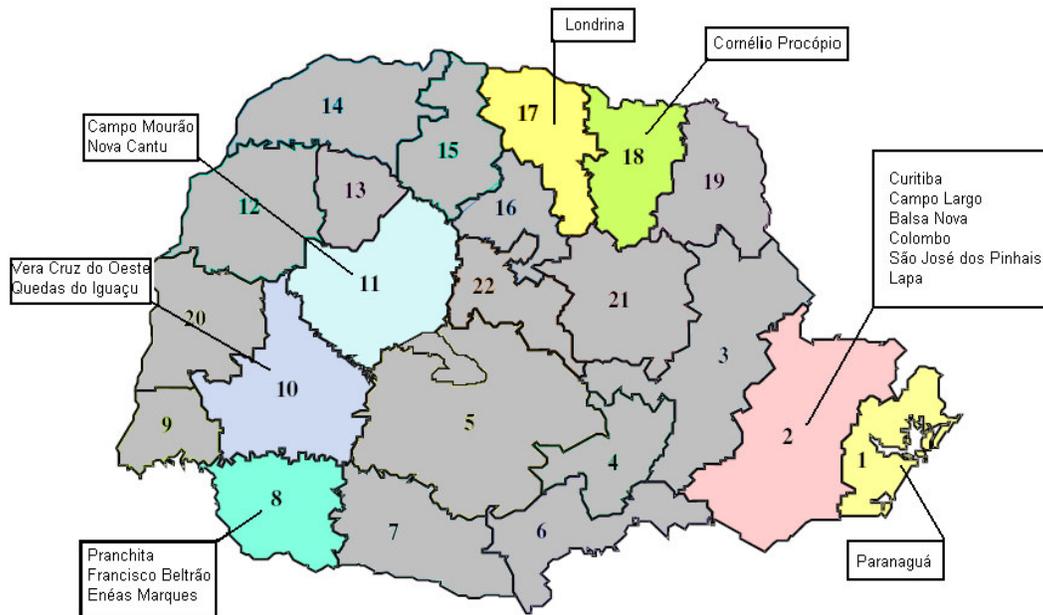
Tabela 6. Número de surtos e casos esporádicos de infecção causada por *Salmonella* por cidade e Regional de Saúde (RS).

RS	Cidades	Número de Surtos - %		Casos Esporádicos - %	
1° RS	Paranaguá	2	9,1%	1	3,8%
2° RS	Balsa Nova			1	3,8%
	Campo Largo	1	4,5%	1	3,8%
	Colombo	1	4,5%	1	3,8%
	Curitiba	8	36,4%	20	76,9%
	Lapa	1	4,5%		
	São José dos Pinhais	1	4,5%		
8° RS	Enéas Marques	1	4,5%		
	Francisco Beltrão	1	4,5%		
	Pranchita	1	4,5%		
10° RS	Vera Cruz do Oeste	1	4,5%		
	Quedas do Iguaçu			1	3,8%
11° RS	Campo Mourão	2	9,1%		
	Nova Cantu	1	4,5%		
17° RS	Londrina			1	3,8%
18° RS	Cornélio Procópio	1	4,5%		
Total		22	100%	26	100%

A Figura 1 mostra as 22 Regionais de Saúde do Estado do Paraná, evidenciando as regiões e respectivas cidades onde ocorreram os surtos e/ou

casos isolados de infecção causados por estirpes de *Salmonella* que fizeram parte deste estudo.

Figura 1. Localização das Regionais de Saúde do Estado do Paraná e cidades onde ocorreram infecções causadas por *Salmonella* analisadas neste estudo\*.



\*Adaptado da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná:  
[www.saude.pr.gov.br/ftp/Mapas/REGIONAIS.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/ftp/Mapas/REGIONAIS.pdf)

A maior incidência de surtos e casos esporádicos de doença causada por *Salmonella enterica* foi observada em Curitiba e municípios da região metropolitana, onde ocorreram 58,3% dos casos de doença no período estudado.

## 5.1 SOROTIPAGEM

Os resultados referentes ao sorotipo das 102 estirpes de *Salmonella enterica* estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7. Freqüência dos sorotipos de *Salmonella enterica* isoladas de amostras clínicas humanas no Paraná, de outubro de 2002 a maio de 2004.

<b>SOROTIPO</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<i>Salmonella</i> London	1	0,98
<i>Samonella</i> Derby	1	0,98
<i>Salmonella</i> Saintpaul	1	0,98
<i>Salmonella</i> Weltvreden	1	0,98
<i>Salmonella</i> Newport	1	0,98
<i>Salmonella</i> Javiana	1	0,98
<i>Salmonella enterica</i> subspécie <i>enterica</i> 8,20;z 4, Z <sub>23</sub> :-	1	0,98
<i>Salmonella</i> Typhimurium	1	0,98
<i>Salmonella</i> Panama	2	1,96
<i>Salmonella</i> Muenster	3	2,94
<i>Salmonella</i> Livingstone	5	4,90
<i>Salmonella</i> Enteritidis	84	82,36

Doze diferentes sorotipos de *Salmonella enterica* foram identificados. O sorotipo predominante foi *Salmonella* Enteritidis (82,36%).

Entre os 22 surtos de gastroenterite, 20 (91%) ,foram causados por *Salmonella* Enteritidis, 1 (4,5%) por *Salmonella* Livingstone e 1 (4,5%) por *Salmonella* Muenster. Do sorotipo Enteritidis, 68 estirpes foram analisadas. *Salmonella* Livingstone (4,9%) e *Salmonella* Muenster (2,94%) foram isoladas em surtos únicos ocorridos respectivamente, em Vera Cruz do Oeste (10<sup>a</sup> RS) e Curitiba (2<sup>a</sup> RS), correspondendo cada um a 4,5% do total de surtos.

Entre os 26 casos de infecções esporádicas, 22 (84,7%) representavam casos de gastroenterite, 2 (7,7%) meningites, 1 (3,8%) bacteremia, e 1 (3,8%) infecção de trato urinário. *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo predominante, isolado em 16 casos (61,5%). Destes, 15 eram casos de gastroenterite e 1 de

bacteremia, ocorrido em criança de 7 anos. *Salmonella* Panama (1,96%) foi isolada em dois casos isolados de infecção, um deles gastroenterite e o outro infecção urinária, ambos ocorridos em Curitiba. Os sorotipos Newport, Muenster, London, Weltvreden, Saintpaul e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* 8,20:z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub>:- foram isolados de casos de gastroenterite cada um com freqüência de 0,98%. *Salmonella* Javiana e *Salmonella* Derby foram isoladas do LCR das crianças de 2 e 4 meses de idade, em Londrina e Curitiba, respectivamente. Entre os 26 casos esporádicos de infecção por *Salmonella*, 9 (34,6%) eram pessoas hospitalizadas.

Quando se considera apenas uma estirpe de *Salmonella* Enteritidis, dev *Salmonella* Muenster e de *Salmonella* Livingstone por surto, e os sorotipos encontrados em casos esporádicos, a freqüência dos sorotipos Newport, London, Weltvreden, Saintpaul, Typhimurium, Javiana, Derby, 8,20:z<sub>4</sub>, z<sub>23</sub>, Livingstone e Muenster é 2,1% cada um, o sorotipo Panama apresentou freqüência de 4,2%, e o sorotipo Enteritidis apresentou freqüência de 75%.

## 5.2 RAPD - PCR

Como a metodologia do RAPD-PCR é suscetível a problemas na reprodutibilidade, inicialmente foram realizados ensaios visando padronizar as concentrações de DNA, MgCl<sub>2</sub>, Taq DNA polimerase e iniciadores utilizados na subtipagem.

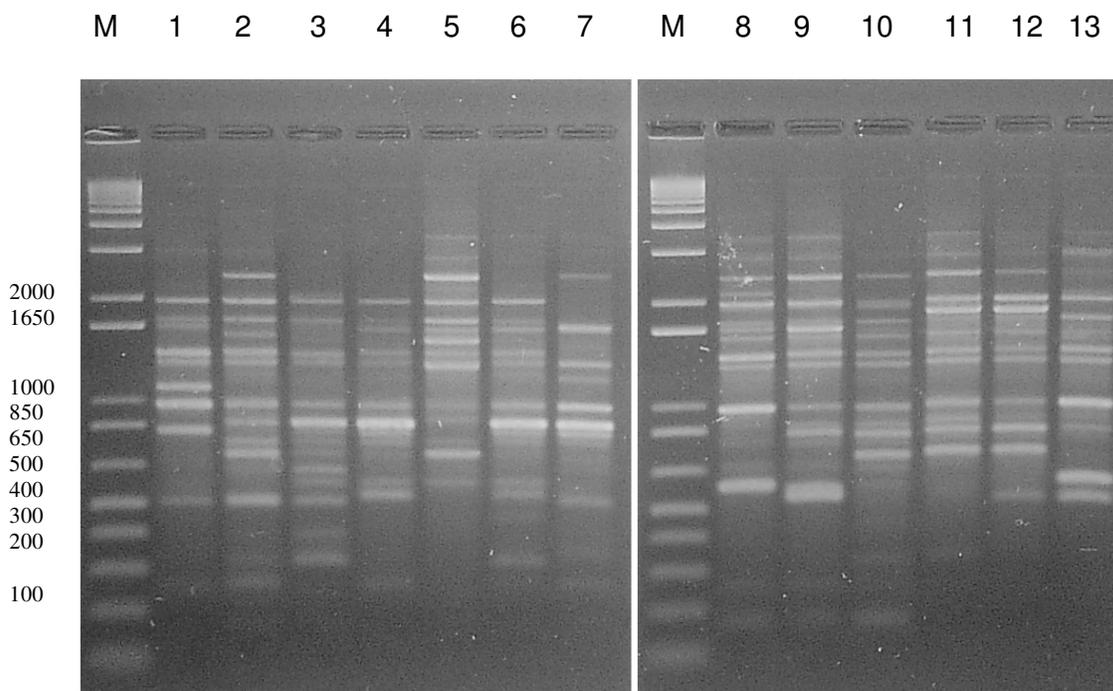
A realização de RAPD-PCR frente a uma curva de concentração de DNA demonstrou que de 20 a 100ng/uL de DNA o padrão de bandas foi reprodutível. Desta forma, foi padronizada a concentração de aproximadamente 50 ng/μL de DNA por reação. Em relação ao MgCl<sub>2</sub>, foi padronizada a concentração de 3,5 mM e para a Taq DNA polimerase, 1,25 U por teste.

As concentrações padronizadas para os iniciadores foram de 50 pmol para P1254, OPB6, OPB15 e OPB17; 30 pmol para 23L e 25 pmol para OPA4. Para cada iniciador um único lote de Super Mix foi utilizado para as reações de RAPD-PCR de todas as estirpes.

### 5.2.1 RAPD-PCR com o iniciador OPA - 4

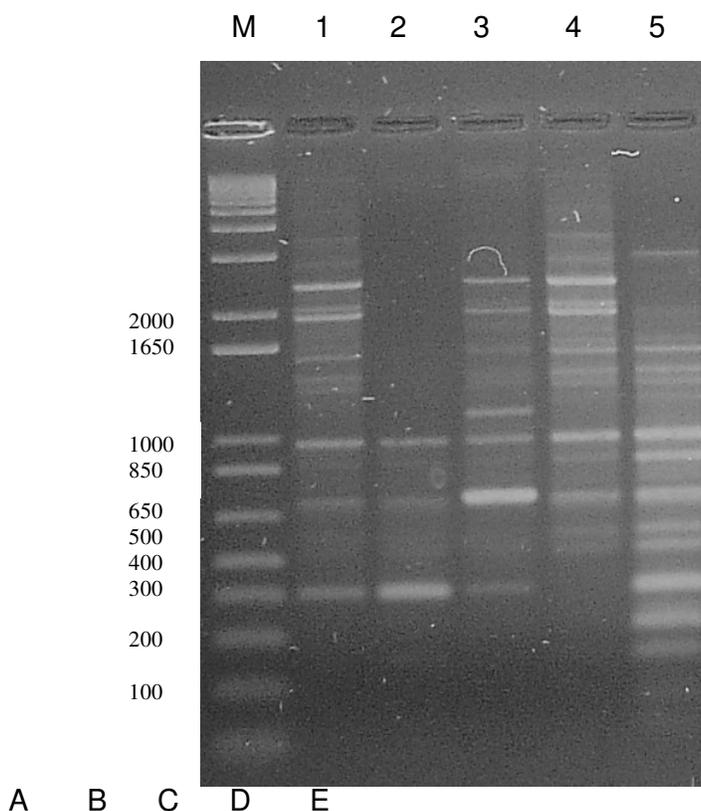
Os resultados de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPA-4 estão indicados nas Figuras 2 e 3.

Figura 2. Perfis de amplificação de DNA de sorotipos de *Salmonella enterica* por RAPD-PCR com iniciador OPA – 4.



M: 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 1. *Salmonella* Muenster; 2. *Salmonella* Derby; 3. *Salmonella* Weltevreden; 4. *Salmonella* Panama; 5. *Salmonella* Newport; 6. *Salmonella* Panama; 7. *Salmonella* Javiana; M: 1kb plus DNA Ladder (Invitrogen); 8. *Salmonella* London; 9. *Salmonella* sorotipo 8,20:z<sub>4</sub>, z<sub>23</sub>:;-; 10. *Salmonella* Saintpaul; 11. *Salmonella* Typhimurium; 12. *Salmonella* Choleraesuis ATCC 14028; 13. *Salmonella* Livingstone.

Figura 3. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPA - 4 para estirpes de *Salmonella* Enteritidis.



M. 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. estirpe 02/02; 2. estirpe 53/03; 3. estirpe 01/02; 4. estirpe 55/04; 5. estirpe 88/04. A, B, C, D e E: diferentes perfis.

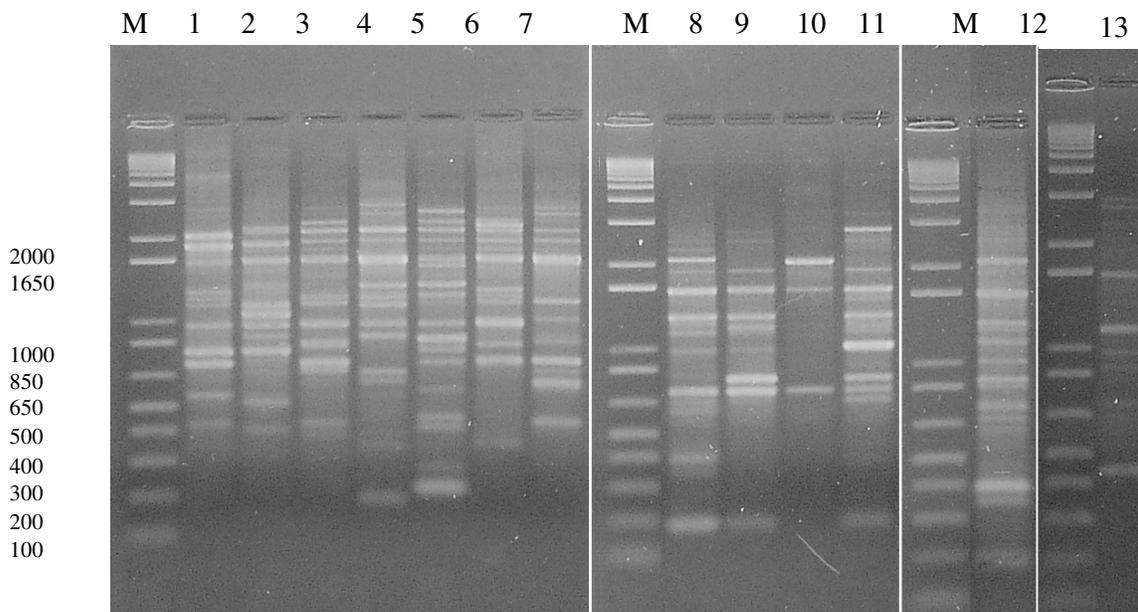
Com o iniciador OPA-4 diferentes perfis foram observados para as estirpes de *Salmonella* sorotipos não Enteritidis analisados (Figura 2). Para as estirpes de *Salmonella* Enteritidis (Figura 3) foram observados 5 perfis distintos, com bandas variando de 250pb até aproximadamente 3.000 pb: perfil A - 400 pb, 500 pb, 570 pb, 670 pb, 870 pb, 980 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1600 pb, 1650 pb, 1900 pb, 2000 pb, 2400pb, 2900pb; B - 400 pb, 500 pb, 570 pb, 670 pb, 870 pb, 980 pb; C - 400 pb, 500 pb, 570 pb, 670 pb, 870 pb, 980 pb, 1200 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1600 pb, 1650 pb, 1900 pb, 2400 pb; D - 500 pb, 570 pb, 670 pb, 870 pb, 980 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1600 pb, 1650 pb, 1900 pb, 2000pb, 2400pb, 2900pb; E - 250 pb, 300 pb, 400 pb, 500 pb, 570 pb, 670 pb, 870 pb, 980 pb, 1250pb, 1300pb, 1400pb, 1600pb, 1650pb, 3000pb. Bandas maiores de 3.000pb não foram consideradas por não terem se mostrado reprodutíveis.

A maioria das estirpes de *Salmonella* Enteritidis estudadas apresentaram o perfil A. Os perfis B, C, D e E foram observados em estirpes de *Salmonella* Enteritidis isoladas de casos esporádicos da doença.

#### 5.2.2 RAPD-PCR com o iniciador 23L

Os perfis obtidos para as estirpes de *Salmonella enterica* pertencentes a outros sorotipos que não Enteritidis estão mostrados na Figura 4 e para as estirpes de *Salmonella* Enteritidis na Figura 5.

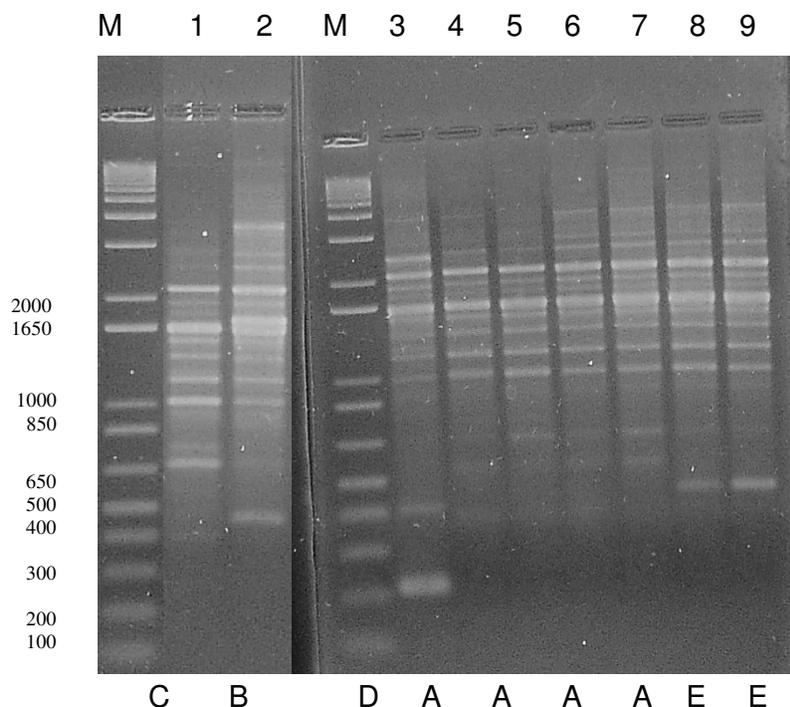
Figura 4. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador 23L para sorotipos de *Salmonella enterica*.



M. 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. *Salmonella* Muenster; 2. *Salmonella* Weltvreden; 3. *Salmonella* Panama; 4. *Salmonella* Newport; 5. *Salmonella* Panama; 6. *Salmonella* Javiana; 7. *Salmonella* London; 8. *Salmonella* Saint Paul; 9. *Salmonella* Choleraesuis ATCC 14028; 10. *Salmonella* Livingstone; 11. *Salmonella* Typhimurium; 12. *Salmonella* 8,20;<sub>Z</sub>4,<sub>Z</sub>23:-; 13. *Salmonella* Derby.

Os perfis obtidos para as estirpes de Enteritidis estão mostrados na Figura 5.

Figura 5. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador 23L para estirpes de *Salmonella* Enteritidis.



M: 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. estirpe 91/04; 2. estirpe 62/04; 3. estirpe 01/02; 4. estirpe 20/02; 5. estirpe 30/03; 6. estirpe 42/03; 7. estirpe 51/03; 8. estirpe 52/03; 9. estirpe 64/04.

Perfis de RAPD-PCR distintos foram obtidos com o iniciador 23L para os sorotipos de *Salmonella enterica* indicados na Figura 4. Para *Salmonella* Enteritidis (Figura 5) o padrão de bandas gerado pelo iniciador 23L compreendeu bandas que variaram de 200 a aproximadamente 3500 pb. Cinco perfis distintos foram observados : A - 650 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1400 pb, 1500 pb, 1650 pb, 1800 pb, 1900 pb, 2100 pb, 2500 pb, 2800 pb, 3500 pb; B - 450 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1400 pb, 1500 pb, 1650 pb, 1700 pb, 1800 pb, 1900 pb, 2100 pb, 2500 pb, 2800 pb, 3500 pb; C - 650 pb, 750 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1400 pb, 1500 pb, 1650 pb, 1900 pb, 2100 pb; D - : 200 pb, 400 pb, 1000 pb, 1200 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1500 pb, 1650 pb, 1900 pb, 2100 pb, 2500 pb, 2800 pb, 3500 pb; E - 500 pb, 650pb, 100 pb, 1300 pb, 1400 pb, 1500 pb, 1900 pb, 2100 pb.

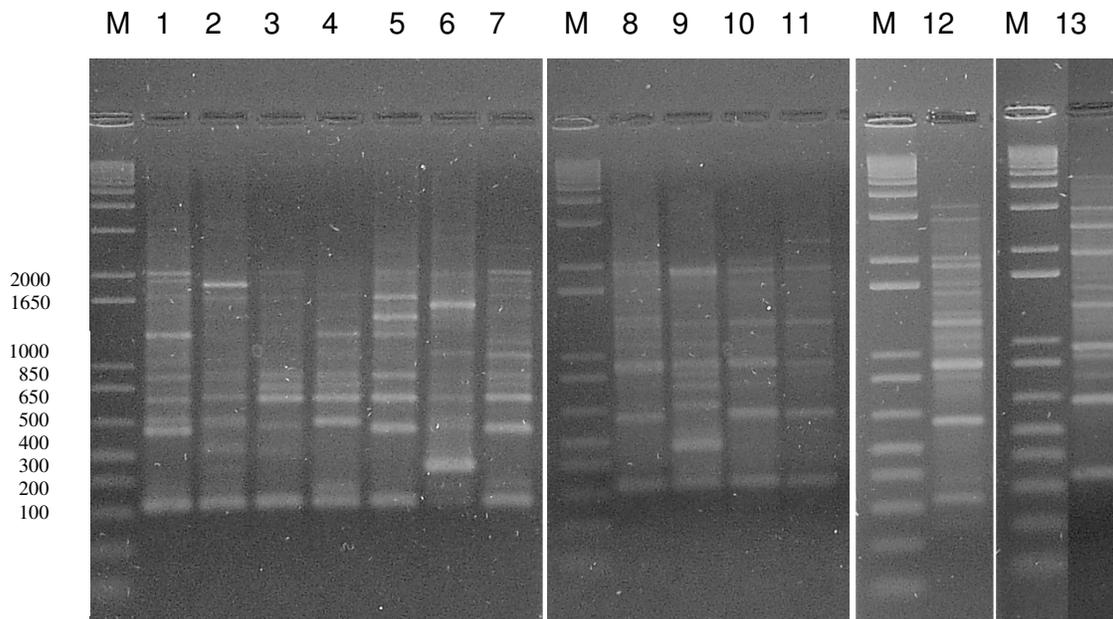
As estirpes cujo padrão de bandas está representado nas posições 5, 6, 7 e 8 representam o perfil de RAPD-PCR mais comum para as estirpes de *Salmonella*

Enteritidis analisadas, o perfil A. As estirpes cujos perfis são mostrados na posição 1, 91/04, e 2 , 62/04, representam dois surtos ocorridos na cidade de Curitiba, com perfis C e B, respectivamente. A estirpe da posição 4, é a 01/02, caso esporádico de infecção, apresentou perfil D. A estirpe 52/03, da posição 9, é uma amostra de caso esporádico de infecção que ocorreu em Balsa Nova, região metropolitana de Curitiba com perfil E.

### 5.2.3 RAPD-PCR com o Iniciador P1254

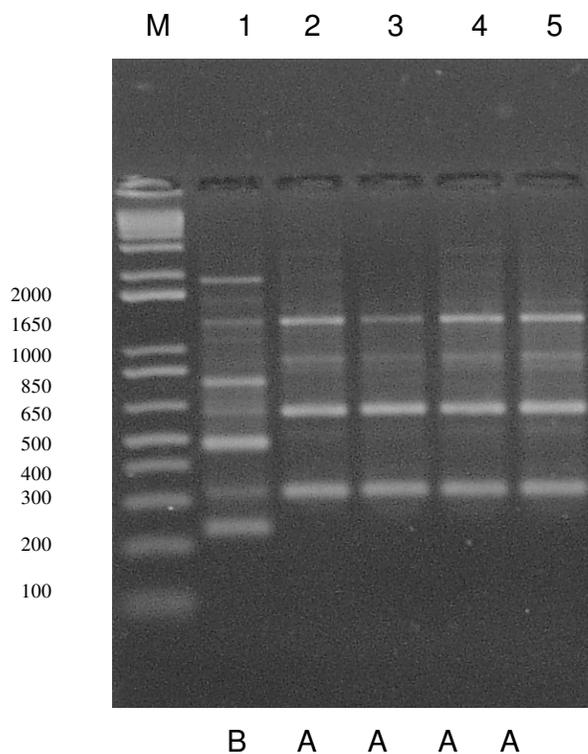
Os padrões obtidos com o iniciador P1254 para diversos sorotipos de *Salmonella enterica* estão na Figura 6. Os perfis obtidos para *Salmonella* Enteritidis estão na Figura 7.

Figura 6. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador P1254 para sorotipos de *Salmonella enterica*



M. 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. *Salmonella* Livingstone; 2. *Salmonella* Weltvreden; 3. *Salmonella* Panama; 4. *Salmonella* Muenster; 5. *Salmonella* Newport; 6. *Salmonella* Panama; 7. *Salmonella* Javiana; 8. *Salmonella* London; 9. *Salmonella* sorotipo 8,20:z<sub>4</sub>, z<sub>23</sub> : -; 10. *Salmonella* Saintpaul; 11. *Salmonella* Derby; 12. *Salmonella* Typhimurium; 13. *Salmonella* Choleraesuis ATCC 14028.

Figura 7: Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador P1254 para estirpes de *Salmonella* Enteritidis.



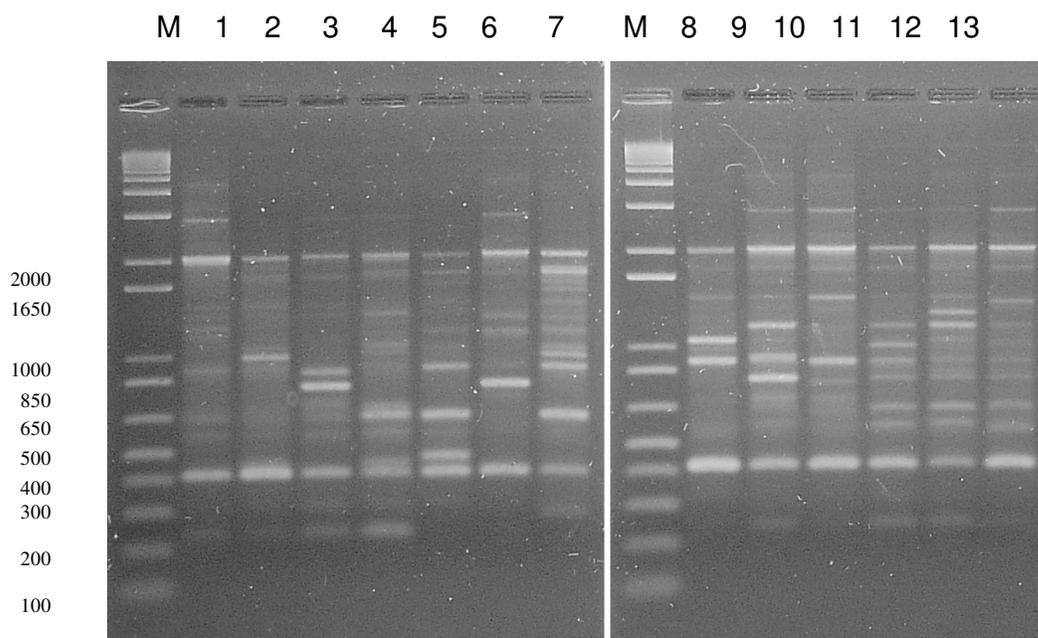
M. 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. estirpe 01/02; 2. estirpe 02/02; 3. estirpe 04/02; 4. estirpe 09/02; 5. estirpe 11/02.

Os perfis de RAPD-PCR foram distintos para os vários sorotipos de *Salmonella enterica* analisados. Para as estirpes de *Salmonella* Enteritidis, foram observadas bandas que variaram de 250 a 2500 pb, mas apenas 2 perfis foram identificados: A - 300 pb, 650 pb, 900 pb, 1500 pb e B - 250, pb 300 pb, 500, pb, 650, pb, 800 pb, 1500, pb, 2500pb. Com exceção da estirpe 01/02, proveniente de um caso isolado de infecção ocorrido na cidade de Curitiba, todas as demais apresentaram o perfil B.

#### 5.2.4 RAPD-PCR com o iniciador OPB - 6

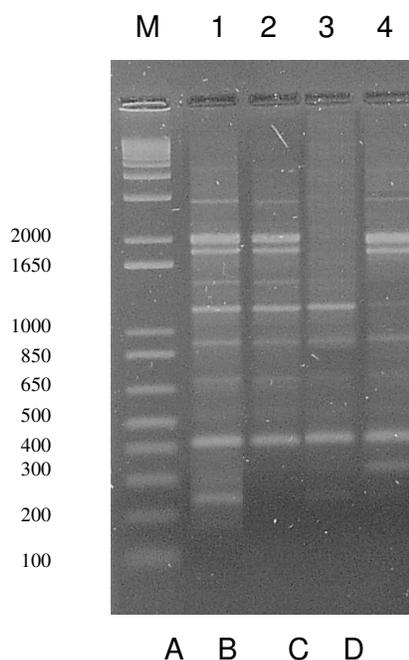
As Figuras 8 e 9 indicam os perfis obtidos com o iniciador OPB - 6 para os vários sorotipos de *Salmonella enterica* analisados e para as estirpes de *Salmonella* Enteritidis, respectivamente.

Figura 8. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB – 6 para sorotipos de *Salmonella enterica*



M. 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. *Salmonella* Livingstone; 2. *Salmonella* Muenster; 3. *Salmonella* Derby; 4. *Salmonella* Weltvreden; 5. *Salmonella* Panama; 6. *Salmonella* Newport; 7. *Salmonella* Panamá; 8. *Salmonella* Javiana; 9. *Salmonella* London; 10. *Salmonella* 8,20;z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub>: - ; 11. *Salmonella* Saintpaul; 12. *Salmonella* Typhimurium; 13. *Salmonella* Choleraesuis ATCC 14028.

Figura 9. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB – 6 para estirpes de *Salmonella* Enteritidis.



M. 1kb plus DNA ladder; 1. estirpe 02/02; 2. estirpe 62/04; 3. estirpe 73/04; 4. estirpe 91/04.

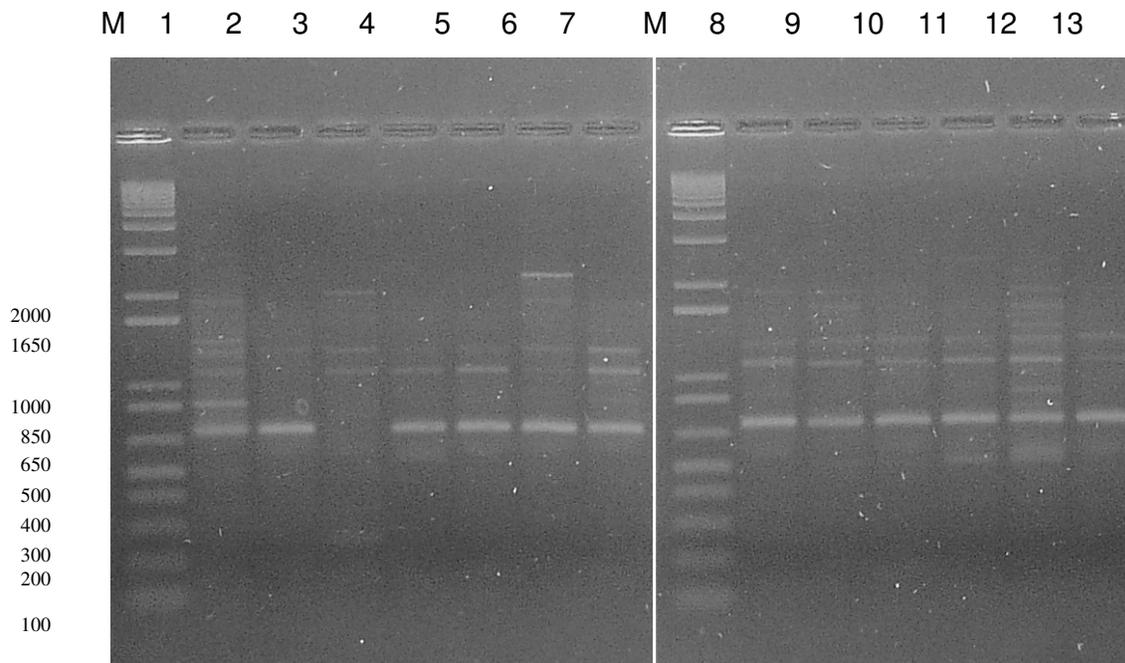
A RAPD-PCR realizada com o iniciador OPB – 6 também mostrou perfis distintos para os diversos sorotipos de *Salmonella enterica* analisadas. Para as estirpes de *Salmonella* Enteritidis foram observadas bandas de amplificação variando de 250 a 2900 pb. Quatro perfis distintos foram gerados: A - 250 pb, 420 pb, 670 pb, 870 pb, 1200 pb, 1400 pb, 1800 pb, 2000 pb, 2900 pb; B - 420 pb, 670 pb, 870 pb, 1200 pb, 1400 pb, 1800 pb, 2000 pb, 2900 pb; C - 250pb, 420 pb, 670 pb, 870 pb, 1200 pb; D - 320 pb, 420 pb, 670 pb, 870 pb, 1200 pb, 1800 pb, 2000 pb, 2900 pb.

A maioria das estirpes apresentou o perfil A. O perfil B foi observado para as estirpes 62/04 e 63/04, representantes de um surto de doença gastrointestinal ocorrido em Curitiba em 2004. O perfil C foi observado nas estirpes 71/04, 72/04 e 73/04 identificadas em casos isolados de doença gastrointestinal. O perfil D foi observado em 6 estirpes isoladas de surto ocorrido em Curitiba em 2004.

### 5.2.5. RAPD-PCR com o iniciador OPB - 15

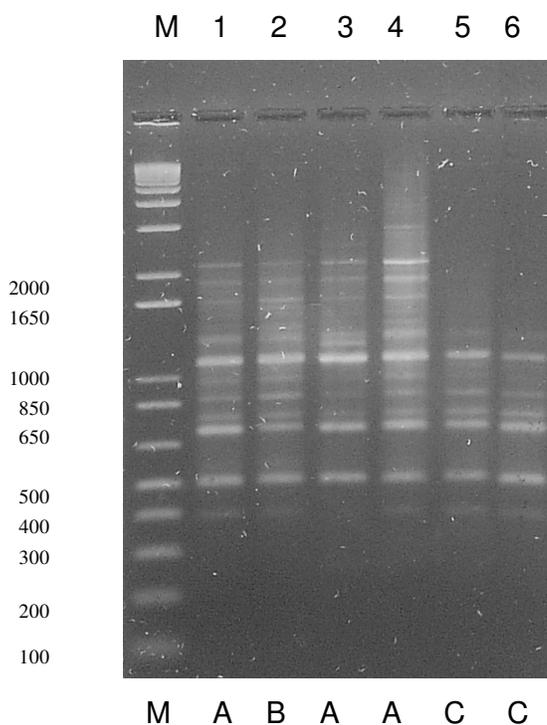
Os perfis de RAPD-PCR obtidos para os sorotipos de *Salmonella enterica* e para *Salmonella* Enteritidis podem ser visualizados nas Figuras 10 e 11, respectivamente.

Figura 10. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 15 para sorotipos de *Salmonella enterica*.



M. 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. *Salmonella* Livingstone; 2. *Salmonella* Muenster; 3. *Salmonella* Derby; 4. *Salmonella* Weltvreden; 5. *Salmonella* Panama; 6. *Salmonella* Newport; 7. *Salmonella* Panama; 8. *Salmonella* Javiana; 9. *Salmonella* London; 10. *Salmonella* 8,20:z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub>: - ; 11. *Salmonella* Saintpaul; 12. *Salmonella* Typhimurium; 13. *Salmonella* Choleraesuis ATCC 14028.

Figura 11. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB – 15 para estirpes de *Salmonella* Enteritidis.



M. 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. amostra 30/03; 2. 18/03; 3. 52/03; 4. 88/04; 5. 72/04; 6. 53/03.

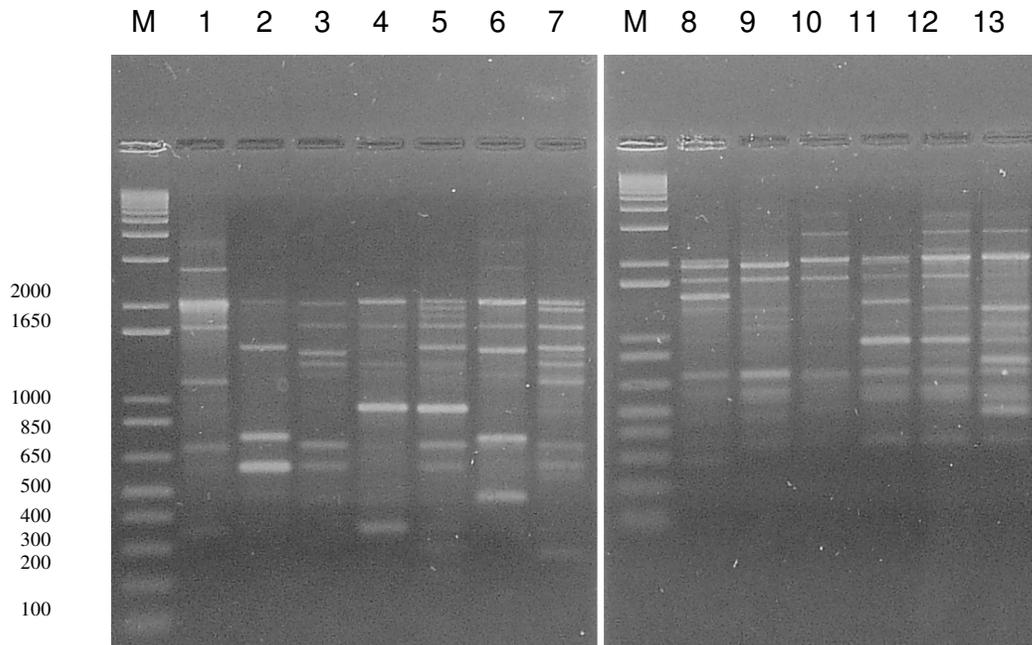
O iniciador OPB – 15 não permitiu discriminar entre os sorotipos de *Salmonella enterica*. Para *Salmonella* Enteritidis 3 perfis foram observados: A - 400 pb, 500 pb, 700 pb, 750 pb, 870 pb, 950 pb, 1200 pb, 1300 pb, 1650 pb, 1800 pb, 2100 pb; .B: 500 pb, 700 pb, 750 pb, 870 pb, 950 pb, 1200 pb, 1250 pb, 1300 pb, 1650 pb, 1800, 2100; C: 400 pb, 500 pb, 700 pb, 750 pb, 870 pb, 950 pb, 1200 pb, 1300 pb.

A maioria das estirpes apresentou perfil A. A estirpe 52/03 que apresentou o perfil B, foi isolada de caso esporádico de infecção ocorrido em Curitiba. As estirpes que apresentaram o perfil C (71/04, 72/04 e 73/04), foram isoladas de casos esporádicos de infecção ocorridos em Campo Largo e Curitiba, respectivamente. A estirpe representada na posição 6, amostra 53/03, é proveniente da cidade de Cascavel, e também é um caso esporádico de infecção.

### 5.2.6 RAPD-PCR com o iniciador OPB - 17

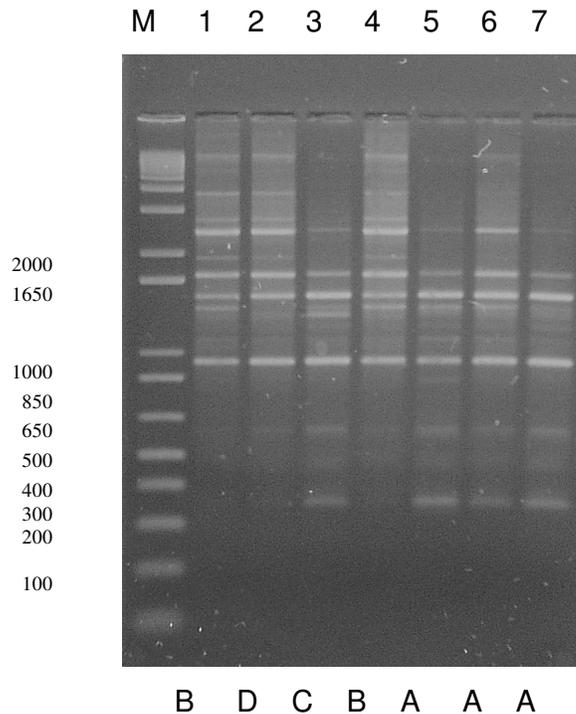
Os perfis obtidos para diversos sorotipos de *Salmonella enterica* e *Salmonella* Enteritidis estão mostrados, respectivamente nas Figuras 12 e 13.

Figura 12. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 17 para sorotipos de *Salmonella enterica*.



M. 1kb plus DNA (Invitrogen); 1. *Salmonella* Livingstone; 2. *Salmonella* Muenster; 3. *Salmonella* Derby; 4. *Salmonella* Weltevreden; 5. *Salmonella* Panama; 6. *Salmonella* Newport; 7. *Salmonella* Panama; 8. *Salmonella* Javiana; 9. *Salmonella* London; 10. *Salmonella* 8,20:z<sub>4</sub>, z<sub>23</sub>: - ; 11. *Salmonella* Saintpaul; 12. *Salmonella* Choleraesuis ATCC 14028; 13. *Salmonella* Typhimurium.

Figura 13. Perfis de RAPD-PCR obtidos com o iniciador OPB - 17 para estirpes de *Salmonella* Enteritidis



M. 1kb plus DNA (Invitrogen); 2. amostra 58/03; 2. 62/04; 3. 91/04; 4. 88/04; 5. 72/04; 6. 04/03; 7. 99/04.

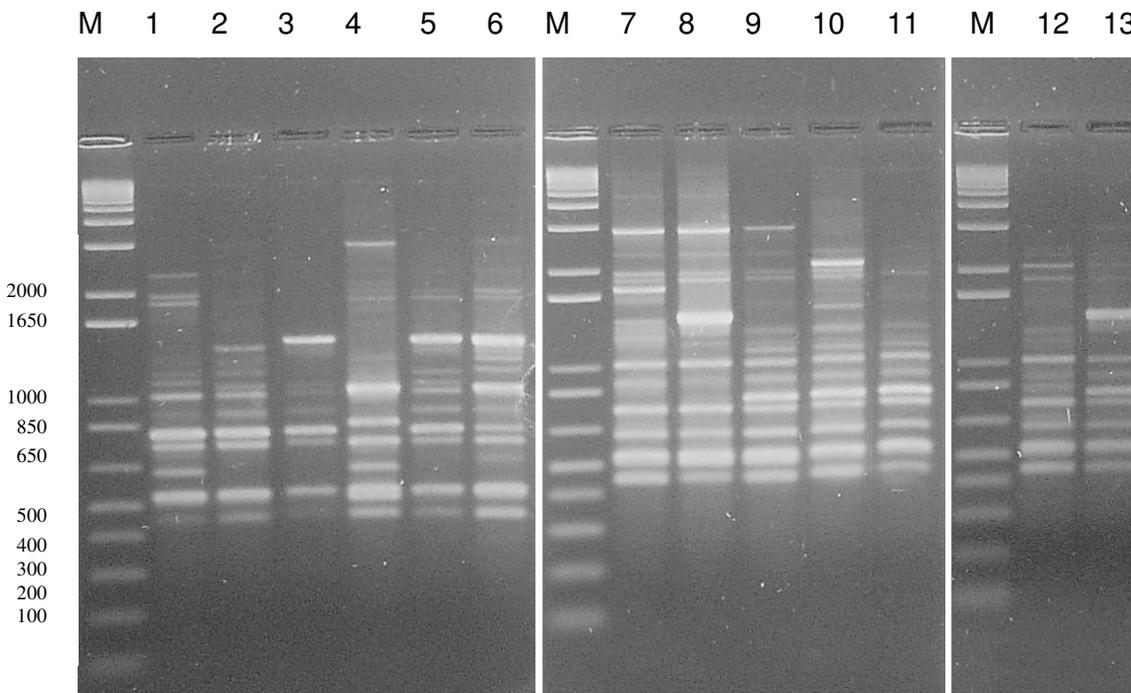
O iniciador OBP – 17 gerou perfis de RAPD-PCR distintos para os sorotipos de *Salmonella enterica* indicados na Figura 12. Para as estirpes de *Salmonella* Enteritidis foram obtidos 4 perfis distintos: A - 350 pb, 640 pb, 900 pb, 1450 pb, 1500 pb, 1650 pb, 1900 pb, 2500 pb; B - 640 pb, 900 pb, 1500 pb, 1650 pb, 1900 pb, 2500 pb, 2800 pb, 3900 pb; C: 350 pb, 640 pb, 900 pb, 1400 pb, 1450 pb, 1500 pb, 1650 pb, 2500 pb; D: 640 pb, 900 pb, 1450 pb, 1500 pb, 1650 pb, 1900 pb, 2500 pb, 2800 pb, 3900 pb.

Os perfis B e C, representam, respectivamente 2 surtos que ocorreram nas cidades de Francisco Beltrão e Curitiba. O perfil D é representado por uma estirpe isolada de caso esporádico de infecção hospitalar em Curitiba. O perfil A, foi apresentado pela maioria das estirpes, representado pelas amostras 72/04, 04/03 e 99/04 nas posições 5, 6 e 7 da figura 13.

### 5.3. SERE – PCR

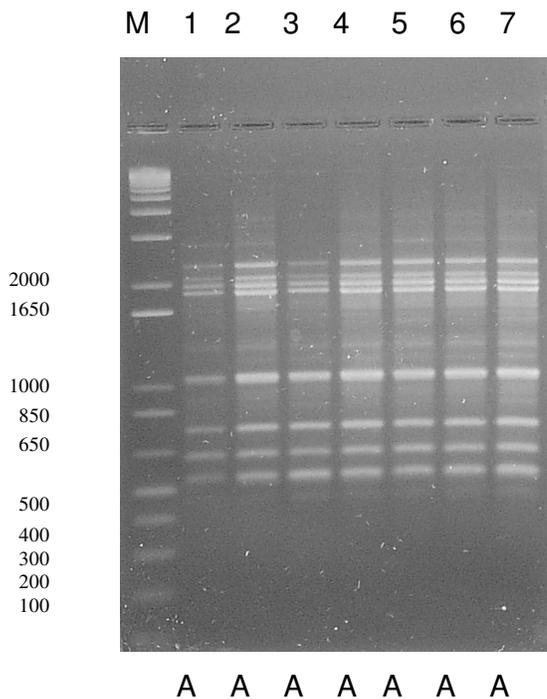
Os perfis de SERE-PCR obtidos para os sorotipos de *Salmonella enterica* estão demonstrados na Figura 14. As análises realizadas pelo SERE-PCR não permitiram diferenciar entre as amostras de *Salmonella* Enteritidis, como pode ser observado na Figura 15.

Figura 14. Perfis de SERE - PCR obtidos para sorotipos de *Salmonella enterica*.



M. 1kb plus DNA ladder (Invitrogen); 1. *Salmonella* Livingstone; 2. *Salmonella* Muenster; 3. *Salmonella* Panama; 4. *Salmonella* Newport; 5. *Salmonella* Panama; 6. *Salmonella* Javiana; 7. *Salmonella* London; 8. *Salmonella* 8,20:z<sub>4</sub>,z<sub>23</sub>:-; 9. *Salmonella* Saintpaul; 10. *Salmonella* Typhimurium; 11. *Salmonella* Choleraesuis ATCC 14028; 12. *Salmonella* Weltvreden; 13. *Salmonella* Derby.

Figura 15. Perfil de SERE - PCR obtido para estirpes de *Salmonella* Enteritidis



M. 1kb plus DNA ladder; 1. estirpe 18/03; 2. estirpe 28/03; 3. estirpe 30/03; 4. estirpe 41/03; 5. estirpe 42/03; 6. estirpe 50/04; 7. estirpe 51/04.

Caracterização do perfil obtido para *Salmonella* Enteritidis, com o iniciador SERE.

A: 500 pb, 640 pb, 750pb, 1100 pb, 1800 pb, 1900 pb, 2000 pb, 2500 pb.

Os perfis obtidos para os iniciadores utilizados para a realização de RAPD-PCR e SERE-PCR para as estirpes de *Salmonella* Enteritidis estão indicados nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8. Perfis de RAPD e SERE para *Salmonella* Enteritidis provenientes de surtos.

<b>Surtos</b>	<b>OPA-4</b>	<b>23L</b>	<b>P1254</b>	<b>OPB-6</b>	<b>OPB-15</b>	<b>OPB-17</b>	<b>SERE</b>
I	A	A	A	A	A	A	A
II	A	A	A	A	A	A	A
III	A	A	A	A	A	A	A
V	A	A	A	A	A	A	A
VI	A	A	A	A	A	A	A
VII	A	A	A	A	A	A	A
VIII	A	A	A	A	A	A	A
X	A	A	A	A	A	A	A
XI	A	A	A	A	A	A	A
XII	A	A	A	A	A	A	A
XIII	A	A	A	A	A	A	A
XIV	A	A	A	A	A	A	A
XV	A	A	A	A	A	B	A
XVI	A	B	A	B	A	D	A
XVII	A	E	A	A	A	A	A
XVIII	A	A	A	A	A	A	A
XIX	A	A	A	A	A	A	A
XX	A	A	A	A	A	A	A
XXI	A	C	A	D	A	C	A
XXII	A	A	A	A	A	A	A

Tabela 9. Perfis de RAPD e SERE para *Salmonella* Enteritidis provenientes de casos esporádicos.

<b>Estirpe</b>	<b>OPA-4</b>	<b>23L</b>	<b>P1254</b>	<b>OPB-6</b>	<b>OPB-15</b>	<b>OPB17</b>	<b>SERE</b>
01/02	C	D	B	A	A	A	A
11/02	A	A	A	A	A	A	A
18/03	A	A	A	A	A	A	A
28/03	A	A	A	A	A	A	A
30/03	A	A	A	A	A	A	A
41/03	A	A	A	A	A	A	A
42/03	A	A	A	A	A	A	A
50/03	A	A	A	A	A	A	A
51/03	A	A	A	A	A	A	A
52/03	A	E	A	A	B	A	A
53/03	B	A	A	A	C	A	A
55/04	D	A	A	A	A	A	A
71/04	A	A	A	C	C	A	A
72/04	A	A	A	C	C	A	A
73/04	A	A	A	C	C	A	A
88/04	E	A	A	A	A	B	A

#### 5.4 DENDROGRAMA

O Dendrograma obtido para o RAPD e SERE estão demonstrados nas Figuras 16a e 16b.

Figura 16a. Dendrograma de 103 estirpes de *Salmonella enterica* construído a partir dos perfis de RAPD obtidos com seis iniciadores.

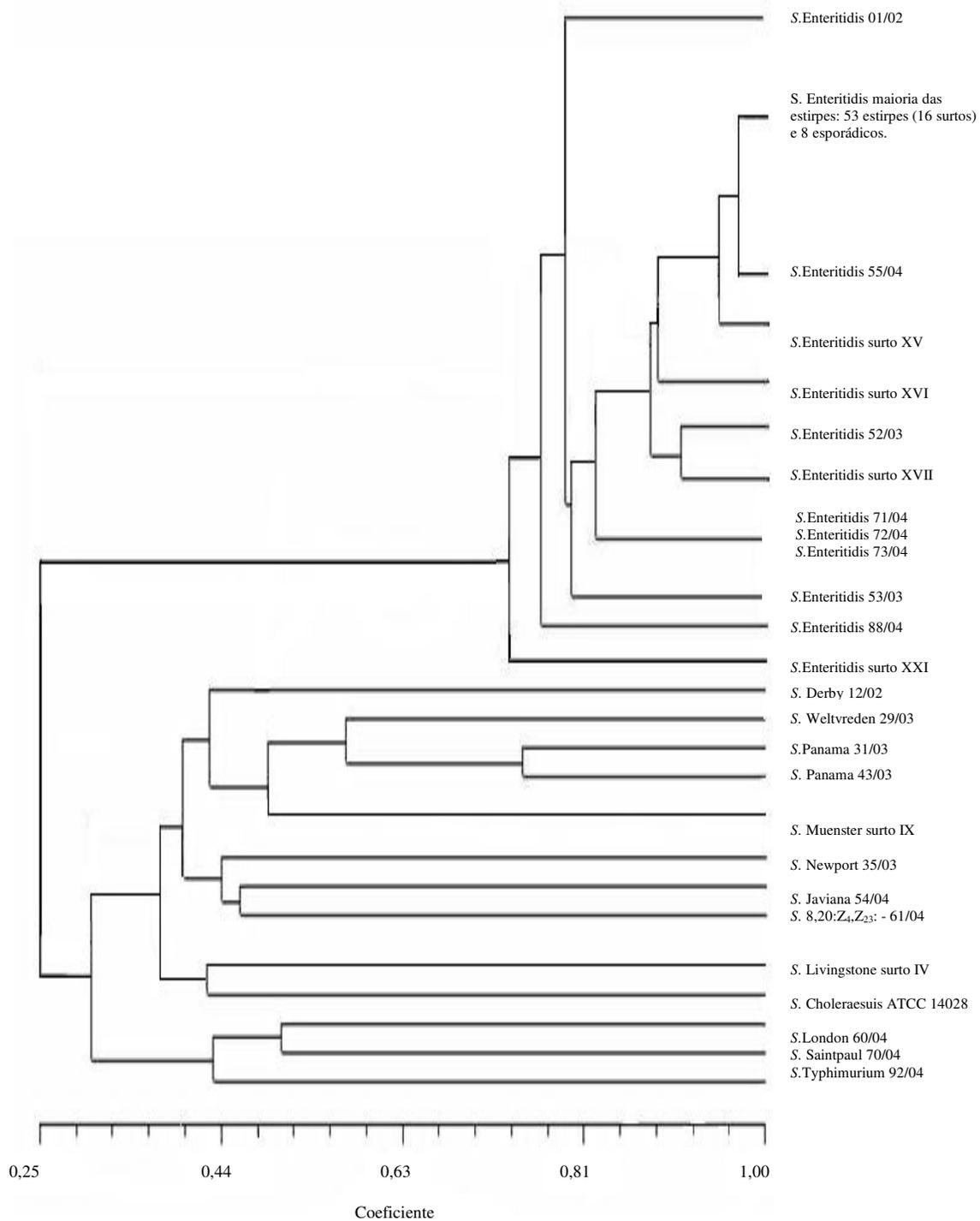
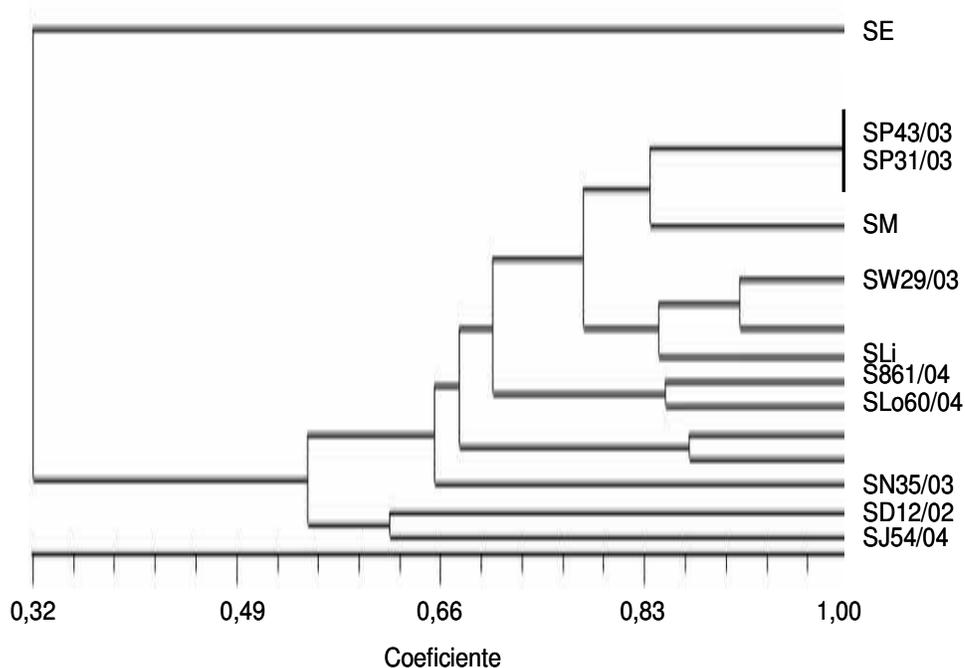


Figura 16b: Dendograma de 103 estirpes de *Salmonella enterica* construído a partir de perfis obtidos com o SERE.



Grupos similares foram definidos pelo método UPGMA utilizando o programa NTSYSpc.

16b: SLi. *Salmonella* Livigstone; SW. *Salmonella* Weltvreden; SS. *Salmonella* Saintpaul; SM. *Salmonella* Muenster; SP. *Salmonella* Panama; SLo. *Salmonella* London; S8. *Salmonella* 8,20:Z<sub>4</sub>,Z<sub>23</sub>:<sup>-</sup>; SN. *Salmonella* Newport; ST. *Salmonella* Typhimurium; SD. *Salmonella* Derby; SJ. *Salmonella* Javiana; SE. *Salmonella* Enteritidis.

## 6 DISCUSSÃO

Cento e dois isolados de *Salmonella enterica* foram identificados em amostras clínicas, predominantemente fezes, provenientes de 7 Regionais de Saúde do Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004. A maior incidência de surtos e casos esporádicos de infecção foi observada em Curitiba e municípios da região metropolitana (Tabela 4). Estes municípios além de concentrarem a maior densidade populacional do Estado estão mais próximos ao LACEN o que pode estimular e facilitar a notificação de surtos e casos esporádicos de infecção. Estes fatores somados podem ser os responsáveis pelo grande número de *Salmonella enterica* na região. Entretanto o número total de surtos ocorridos é desconhecido, já que doenças transmitidas por alimentos não têm notificação obrigatória no Brasil.

*Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo predominante, o que também foi observado em outro trabalho recente realizado no Paraná (NEGRETE, 2004). Este é um dos sorotipos mais freqüentes no país e em outros lugares do mundo (PERESI et al., 1998; HERISKTAD et al., 2002; SILVA e DUARTE, 2002; CDC, 2004; WEINBERGER e KELLER, 2005).

Entre os demais sorotipos de *Salmonella* identificados, apenas *Salmonella* London, *Salmonella* Muenster e *Salmonella* sorotipo 8,20:z4, z23:- não estão citadas entre as mais frequentemente isoladas de amostras clínicas de humanos (HERISKTAD et al., 2002; SILVA e DUARTE, 2002; CDC, 2004; CHIU et al., 2004; WEINBERGER e KELLER, 2005).

Os sistemas de tipagem bacterianos são baseados em análises fenotípicas ou genotípicas de múltiplos isolados de uma espécie particular para identificar características que possam subdividir as estirpes em grupos menores. Contudo, a subtipagem é mais frequentemente utilizada para diferenciar isolados dissimilares do que para confirmar um parentesco entre duas estirpes diferentes (POWER, 1996; ARBEIT, 1999). A premissa básica dos sistemas de tipagem é que as estirpes isoladas de um grupo epidemiológico surgem de um antecessor comum (clone) e, portanto compartilham certas características que as distinguem de estirpes epidemiologicamente não relacionadas da mesma espécie (POWER, 1996). RAPD-PCR é uma técnica que não requer conhecimento prévio do DNA a

ser analisado. Um ou mais iniciadores de tamanho variável são selecionados arbitrariamente e anelam ao DNA molde em condições de baixa estringência. Os produtos são então resolvidos através de eletroforese gerando padrões de bandas de DNA que diferem de acordo com o grau de parentesco das estirpes em análise (FARBER, 1996; POWER, 1996).

Esta técnica tem sido utilizada em diversos estudos de tipagem de microrganismos patogênicos, é rápida, relativamente barata e aplicável teoricamente a qualquer organismo. RAPD-PCR também tem sido utilizada para a tipagem de *Salmonella* (BETANCOR et al., 2004; SOTO et al., 1999; LIN et al., 1996; FADL et al., 1995) e apesar de algumas preocupações em relação a reprodutibilidade do método (TYLER et al., 1997; SAUNDERS et al., 2001), foi observado que quando um grupo apropriado de iniciadores é escolhido esse método é uma alternativa rápida, reprodutiva e eficiente para a tipagem genética de *Salmonella* Enteritidis (LIN et al., 1996).

Os parâmetros básicos que afetam a subtipagem pelo RAPD-PCR incluem as condições de reação. Uma característica do RAPD-PCR é a temperatura de anelamento relativamente baixa de 25 a 40°C necessária para a amplificação adequada. Componentes do tampão como  $Mg^{2+}$  por exemplo, podem influenciar as reações do mesmo modo que influenciam a PCR convencional. O número de ciclos entre 35 e 50 não parece influenciar os perfis de RAPD, mas um número menor de ciclos resulta na ausência de algumas bandas.

Considerando as baixas temperaturas de anelamento, a seqüência dos iniciadores não é um grande problema. Os padrões de bandas serão gerados dependendo do número e freqüência dos sítios de anelamento no DNA molde. Como isto é difícil de prever, diversas combinações de iniciadores devem ser testadas (POWER, 1996). A polimerização é iniciada com várias eficiências nessas regiões e as quantidades finais de DNA produzidas podem variar amplamente entre os diferentes fragmentos amplificados de um dado isolado. Essa variação é inerente à RAPD-PCR, está quase sempre presente, e dificulta comparar e interpretar perfis cujas bandas demonstram diferenças na intensidade. Como alguns dos produtos podem representar reações relativamente ineficientes, os fragmentos reais gerados de um isolado particular podem variar substancialmente entre diferentes reações de amplificação devido a variações menores na

temperatura, concentração de  $Mg^{2+}$ , entre outros (POWER, 1996; TYLER et al., 1997; SAUNDERS et al., 2001).

A questão da reprodutibilidade não representa um problema se a técnica for padronizada incluindo o método de preparo de DNA, o uso de volumes e concentrações consistentes de reagentes e da mesma Taq DNA Polimerase, e o mesmo termociclador (BELKUM et al., 1995; FARBER, 1996; POWER, 1996; ARBEIT, 1999).

Diferenças nos resultados combinados de múltiplos ensaios de RAPD-PCR são melhores indicadores de variabilidade genética que os resultados de ensaios individuais (BELKUM et al., 1995), assim o poder discriminatório da técnica pode ser aumentado pela realização de múltiplas amplificações com iniciadores diferentes (ARBEIT, 1999).

A atenção nestes detalhes deve ser suficiente para o uso do RAPD-PCR como técnica para analisar ou identificar um surto. Estes procedimentos, entretanto não eliminam a variação inter-laboratório (BELKUM et al., 1995; POWER, 1996; TYLER et al., 1997).

Neste trabalho estirpes de *Salmonella enterica* foram tipadas pelo RAPD-PCR. As concentrações de iniciadores, Taq DNA polimerase, DNA molde e  $MgCl^{2+}$  foram padronizadas. Bandas foram consideradas presentes ou ausentes independentemente da intensidade. Perfis que diferiam em uma ou mais bandas foram considerados como padrões distintos. A reprodutibilidade foi confirmada comparando os padrões de bandas obtidas através de 3 ensaios distintos.

Perfis de RAPD - PCR distintos foram obtidos para os sorotipos de *Salmonella* analisados (Figuras: 2, 4, 6, 8 e 12), exceto com o iniciador OPB-15 (Figura 10).

Quando as estirpes de *Salmonella* Enteritidis foram analisadas, padrões distintos foram gerados com os diferentes iniciadores, sugerindo a presença de polimorfismos genéticos nessas bactérias. O iniciador OPA-4 gerou 5 perfis distintos. Entretanto um padrão único foi observado para as 68 estirpes isoladas de surtos. Entre as 16 estirpes isoladas de casos esporádicos de doença, 5 perfis foram observados; 12 apresentaram o perfil A, compartilhado com as estirpes provenientes dos surtos. Cada uma das outras 4 estirpes apresentou um perfil distinto B, C, D ou E (Figura 3 e Tabela 9).

Para o iniciador 23L 5 perfis também foram observados. As estirpes isoladas de 17 dos 20 surtos causados por *Salmonella* Enteritidis apresentaram o perfil A. Três apresentaram respectivamente, os padrões B, C ou E. Catorze das estirpes isoladas de casos esporádicos de doença apresentaram o perfil A, uma apresentou o perfil D e outra o perfil E (Figura 5 e Tabelas 8 e 9).

Com o iniciador 1254 apenas 2 perfis de RAPD-PCR foram observados. O perfil A foi observado em todas as estirpes isoladas de surtos. Apenas uma das 16 estirpes provenientes de casos esporádicos de doença apresentou o perfil B.

Para o iniciador OPB-6 4 perfis distintos foram observados. O perfil A foi exibido pelas estirpes de 18 dos 20 surtos, e os perfis B e D para as estirpes isoladas dos outros dois surtos. Para as estirpes isoladas de casos esporádicos, 13 apresentaram o perfil A e 3 o perfil C (Figura 9 e Tabelas 8 e 9).

Três perfis foram observados com o iniciador OPB-15. Todas as estirpes isoladas de surtos apresentaram o perfil A, assim como 11 das provenientes de casos esporádicos. O padrão B foi exibido apenas por 1 estirpe e o perfil C por 4 (Figura 11 e Tabelas 8 e 9).

Quatro perfis distintos foram observados para as estirpes de *Salmonella* Enteritidis quando o iniciador OPB-17 foi utilizado para a reação de amplificação. O padrão A foi exibido por 17 das estirpes isoladas de surtos e 15 das de casos esporádicos de infecção. Estirpes isoladas de surtos individuais apresentaram os perfis B, C e D, e apenas uma estirpe de caso isolado apresentou o perfil B (Figura 13 e Tabelas 8 e 9).

Três dos iniciadores utilizados, 23L, OPB-6 e OPB-17 detectaram polimorfismos entre as estirpes isoladas de surtos (Tabela 8).

Os dados de RAPD-PCR foram utilizados para estabelecer um dendrograma baseado na proporção de bandas compartilhadas pelos isolados. Dois grupos principais foram observados. Um compreende as estirpes de *Salmonella* Enteritidis e o outro os demais de sorotipos de *Salmonella* analisados (Figura 16a). No último grupo, os sorotipos foram classificados isoladamente. Para *Salmonella* Panama, da qual dois isolados foram encontrados, um de urina e outro de fezes, ambos ficaram no mesmo grupo, mas não são idênticos.

A similaridade entre as estirpes de *Salmonella* Enteritidis foi de 0,74 e estas foram designadas a 11 diferentes grupos (Tabelas 8 e 9 e Figura 16a). O grupo

principal compreendeu 51 (61%) estirpes soladas de 16 surtos (I, II, III, V a VIII; XVIII, XIX, XX e XXII) e 7 das isoladas de casos esporádicos de infecção. Quatro surtos (XV, XVI, XVII e XXI), foram causados por estirpes geneticamente distintas entre si e em relação ao grupo principal. Três estirpes isoladas de casos esporádicos de diarreia em Curitiba foram reunidas em um único grupo diferente dos demais. As outras 5 estirpes distintas geneticamente foram isolados de caso esporádico de infecção.

Esses dados indicam que há vários tipos de estirpes patogênicas no Estado do Paraná. Um tipo genético distinto é predominante, foi isolado da maioria dos surtos e de diversos casos de infecção esporádica. Maior variabilidade genética foi observada entre as estirpes isoladas de casos esporádicos de infecção, do que nas isoladas de surtos. Isto pode sugerir a presença de um tipo mais virulento e/ou melhor adaptado a infectar humanos disseminado no Estado.

Dados recentes obtidos no Uruguai indicam que há entre os humanos, o nítido predomínio de um tipo genético de *Salmonella* Enteritidis, seja no caso de surtos quanto em casos esporádicos de infecção (BETANCOR et al., 2004).

Aparentemente, no Paraná existe maior variabilidade genética entre as estirpes de *Salmonella* Enteritidis, o que é respaldado por outros trabalhos que indicaram variabilidade genética entre estirpes de *Salmonella* Enteritidis no Paraná (NEGRETE, 2004) e no país (IRINO et al., 1996).

SERE é uma região repetitiva bastante conservada localizada na região regulatória do operon *sefABCD* do genoma de *Salmonella* Enteritidis. SERE contém um hexanucleotídeo conservado nas posições 6 a 12, cuja seqüência (TATATTA) é similar a da região -10 de promotores do tipo -35/-10, e um trinucleotídeo GCA altamente conservado na extremidade 3'. A ampla distribuição e a presença de uma seqüência interna do tipo promotor sugere que SERE está localizado na região regulatória de genes bacterianos assim como está na região 5' do operon *sefABCD* e que pode influenciar a expressão gênica (RAJASHEKARA et al., 1998).

O ensaio de SERE-PCR gerou perfis distintos para os 12 sorotipos de *Salmonella* isolados de amostras clínicas, bem como para *Salmonella* Choleraesuis ATCC 14028 (Figuras 14 e 16b).

Entretanto um único perfil (Figura 15 e 16b) de SERE-PCR foi observado para as 68 estirpes de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos ou de casos esporádicos de infecção indicando que, nas condições analisadas, esse ensaio não apresentou poder discriminatório suficiente para detectar a variabilidade existente entre essas bactérias, como demonstrado pela técnica de RAPD-PCR (Figuras 3, 5, 7, 9, 11 e 13). Uma heterogeneidade limitada nos perfis de SERE-PCR já havia sido relatada para isolados animais e ambientais de *Salmonella* Enteritidis (RAJASHEKARA et al., 1998). Como *Salmonella* Enteritidis é um sorotipo que apresenta ampla distribuição de hospedeiros, o achado de um único perfil entre isolados de humanos é inesperado, pois sugere maior conservação de SERE neste grupo de organismos. Se confirmado esse dado poderia sugerir que a seqüência SERE seja importante para a expressão de genes associados com a infecção em humanos.

## 7 CONCLUSÕES

1. 12 sorotipos de *Salmonella enterica* foram isolados de surtos e casos esporádicos de infecção notificados no período de outubro de 2002 a maio de 2004 no Estado do Paraná.

2. Com relação aos surtos, *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo predominante, sendo responsável por 91%; os sorotipos Livingstone e Muenster foram isolados apenas em surtos únicos, com frequência de 4,5% cada um. Considerando-se somente uma estirpe de *Salmonella* Enteritidis por surto, mais os casos esporádicos de infecção, a frequência de *Salmonella* Enteritidis foi de 75%; os sorotipos Newport, London, Weltvreden, Saintpaul, Typhimurium, Javiana, Derby, 8,20:z4, z23, Livigstone e Muenster apresentaram cada um frequência de 2,1%. O sorotipo Panama apresentou frequência de 4,2%.

3. Realizado sob condições padronizadas o ensaio de RAPD-PCR apresentou boa reprodutibilidade e bom poder discriminatório. Padrões distintos foram observados para os sorotipos de *Salmonella enterica* analisadas.

4. O ensaio de RAPD-PCR foi capaz de discriminar entre as 84 estirpes de *Salmonella* Enteritidis analisadas, classificando-as em 11 grupos. As estirpes isoladas de casos esporádicos de infecção apresentam maior variabilidade genética que aquelas isoladas de surtos.

5. Um subtipo de *Salmonella* Enteritidis predomina nos casos de infecção ocorridos no estado.

6. O ensaio de SERE-PCR gerou perfis distintos para os sorotipos de *Salmonella enterica* analisadas, mas não discriminou entre as estirpes de *Salmonella* Enteritidis nas condições de ensaio utilizadas.

7. RAPD-PCR apresenta maior nível de discriminação que o SERE-PCR.

## REFERÊNCIAS

ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A.B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. Development of a Multiplex PCR technique for detection and epidemiological typing of *Salmonella* in human. **J. Clin. Microbiol.**, 42:1734-1738, 2004.

ARBEIT, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganism. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 7.ed. Washington, ASM Press, 1999. p.116-137.

AUSTIN, J.W.; SANDERS, G.; KAY, W.W.; COLLINSON, S.K. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. **FEMS Microbiol. Lett.**, 162:295-301, 1998.

BARROW, P.A. *Salmonella* - Present, past and future. **Avian Pathology**, 22. 651-669, 1993.

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.**, 66:1544-1552, 2000.

BÄUMLER, A.J.; TSOLIS, R.M.; FICHT, T.A.; ADAMS, L.G. Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. **Infect. Immun.**, 66:4579-4587, 1998.

BELKUM, A.V.; KLUYTMANS, J.; LEEUWEN, W.V.; BAX, R.; QUINT, W.; PETERS, E.; FLUIT, A.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; BRULE, A.V.D.; KOELEMAN, H.; MELCHERS, W.; MEIS, J.; ELAICHOUNI, A.; VANEECHOUTTE, M.; MOONENS, F.; MAES, N.; STRUELENS, M.; TENOVER, F.; VERBRUGH, H. Multicenter evaluation of Arbitrarily Primed PCR for typing of *Staphylococcus aureus* strains. **J.Clin.Microbiol.**, 33:1537-1547, 1995.

BETANCOR, L.; SCHELOTTO, F.; MARTINEZ, A.; PEREIRA, M.; ALGORTA, G., RODRIGUEZ, M.A.; VIGNOLI, 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. **J Clin Microbiol**, 42:1155-1162, 2004.

BOUALLÈGUE-GODET, O.; SALEM, Y.B.; FABRE, L.; DEMARTIN, M.; GRIMONT, P.A.D.; MZOUGH, R.; WEILL, F.X. Nosocomial outbreak caused by *Salmonella enterica* serotype Livingstone producing CTX –M-27 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a neonatal unit in Sousse, Tunisia. **J. Clin. Microbiol.**, 43:1037-1044, 2005.

BOPP, C.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCPBINE, N. *Escherichia, Salmonella and Shigella*. In: BOPP, C.; BRENNER, F.W.; WELLS, J.G.; STROCPBINE, N. **Man. Clin. Microbiol.** 7. Washington , D.C. ASM, 1999. p. 459-474.

BOYD, F.E.; WANG, F.; WHITTAM, T.S.; SELANDER, R.K. Molecular genetic relationships of the *Salmonellae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 62:804-808, 1996.

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

BUTLER, T. Typhoid fever. In: GOLDMAN, L.; BENNETT, J.C. **Cecil textbook of medicine**. 21. ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000. p.1681-1683.

CASTRO, F.A.; SANTOS, V.R.; MARTINS, C.H.G.; FERNANDES, S.A.; ZAIA, J.E.; MARTINEZ, R. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Riberião Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. **Braz. J. Infec. Dis.** 6: 244-251, 2002

CDC. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2003. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2004.

CHIU, C.; TANG, P.; CHU, C.; HU, S.; BAO, Q.; YU, J.; CHOU, Y.; WANG, H.; LEE, Y. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Res.**, 33:1690-1698, 2005.

CHIU, C.; SU, L.; CHU, C. *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. **Clin. Microbiol. Rev.**, 17:311-322, 2004.

CROSA, J.H.; BRENNER, D.J.; EWING, W.H.; FALKOW, S. Molecular relationships among the Salmonellae. **J. Bacteriol.**, 115:307-315, 1973.

D'AOUST, J.Y. Pathogenicity of foodborne *Salmonella*. **Int. J. Food Microbiol.**, 12: 17-40, 1991.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of *Salmonella* with the Intestinal Mucosa. **Clin. Microbiol. Rev.**, 12: 405-428, 1999.

DENG, W.; LIOU, S.; PLUNKETT III, G.; MAYHEW, G.F.; ROSE, D.J.; BURLAND, V.; KODOYIANNI, V.; SCHWARTZ, D.C.; BLATTNER, F.R. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. **J. Bacteriol.**, 185:2330-2337, 2003.

DUIJKEREN, E.V.; WANNET, W.J.B.; HOUWERS, D.J.; PELT, W.V. Serotype and phage type distribution of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. **J. Clin. Microbiol.**, 40:3980-3985, 2002.

DUSCH, H.; ALTWEGG, M. Evaluation of five new plating media for isolation of *Salmonella* species. **J. Clin. Microbiol.**, 33:802-804, 1995.

EDWARDS, R.A.; OLSEN, G.J.; MALOY, S.R. Comparative genomics p closely related *Salmonellae*. **Trends Microbiol. Rev.** 10: 94-99, 2002.

EUZÉBY, J.P. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (Approved lists 1980), rejection of the name *Salmonella Choleraesuis* (Smith 1984) Weldin 1927 (Approved lists 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schroeter 1886) Warren and Scott 1930 (Approved lists 1980). Request for an opinion. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, 49:927-930, 1999.

FADL, A.A.; NGUYEN, A.V.; KHAN, M.I. Analysis of *Salmonella enteritidis* isolates by Arbitrarily Primed PCR. **J. Clin. Microbiol.**, 33:987-989, 1995.

FAKHR, M.K.; NOLAN, L.K.; LOGUE, C.M. Multilocus sequence typing lacks the discriminatory ability of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Clin. Microbiol.**, 43:2215-2219, 2005.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **J. Food Prot.**, 59:1091-1101, 1996.

FARMER III, J.J. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. 7.ed. American Society for Microbiology Press, Washington D.C., 1999. p.442-458.

FASANO, A. Cellular microbiology: how enteric pathogens socialize with their intestinal host. **ASM News**, 63:259-265, 1997.

FERNANDES, S.A.; GHILARDI, A.C.R.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella*

Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 45:59-63, 2003.

FIERER, J.; GUINEY, D.G. Diverse virulence traits underlying different clinical outcomes of *Salmonella* infection. **J. Clin. Invest.**, 7:775-780, 2001.

FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. *Enterobacteriaceae*. In: FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S.; BARON, E.J. **Bailey & Scott's diagnostic microbiology**. 11ed. St. Louis: Mosby, 2002. p. 509-526.

GALAN, J. *Salmonella* Interactions With Host Cells: type III Secretion at Work. **Ann. Rev. Cell Develop. Biol.**, 17: 53-86, 2001.

GARAIJAR, J.; LÓPEZ-MOLINA, N.; LACONCHA, I.; BAGGESEN, D. L.; REMENTERIA, A.; VIVANCO, A.; AUDICANA, A.; PERALEZ, I. Suitability of PCR fingerprint, 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.**, 66:5273-5281, 2000.

GUERIN, M.T.; MARTIN, S.W.; DARLINGTON, G.A.; RAJIC, A. A temporal study of *Salmonella* serovars in animals in Alberta between 1990 and 2001. **Can. J. Vet. Res.**, 69:88-99, 2005.

GUERRANT, R.L. Gastrointestinal infections and food poisoning. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. 4.ed. New York, Churchill Livingstone, 1995. p.945-962.

GUERRANT, R.L.; VAN GILDER, T.; STEINER, T.S.; THIELMAN, N.M.; SLUTSKER, L.; TAUXE, R.V.; HENNESSY, T.; GRIFFIN, P.M.; DUPONT, H.; SACK, R.B.; TARR, P.; NEILL, M.; NACHAMKIN, I.; RELLER, L.B.; OSTERHOLM, M.T.; BENNISH, M. L.; PICKERING, L.K. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. **Clin. Infect. Dis.**, 32:331-350, 2001.

GILLIGAN, P.H.; JANDA, J.M.; KARMALI, M.A.; MILLER, J.M. **Lab. Diag. Bact. Diarreha. CUMITECH, 12A.**, Washington, D.C., ASM. 28p., 1992.

HELMS, M.; VASTRUP, P.; GERNER-SMIDT, P.; MOLBAK, K. Short and long term mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections: registry based study. **BMJ**, 326, 357-361, 2003.

HERISKTAD, H.; MOTARJEMI, Y.; TAUXE, R.V. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. **Epidemiol. Infect.**, 129:1-8, 2002.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **Int. J. Med. Microbiol.**, 294:95-102, 2004.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.**, 17:55-62, 1997.

HOLMBERG, S.D.; WACHSMUTH, I.K.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; COHEN, M.L. Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella typhimurium* isolates from outbreaks. **J. Clin. Microbiol.**, 19:100-104, 1984.

HUMPHREY, T. *Salmonella*, stress responses and food safety. **Nature Rev. Microbiol.**, 2:504-509, 2004.

IRINO, K., FERNANDES, S.A., TAVECHIO, A.T., NEVES, B.C. and DIAS, A.M.G. Preogression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo.**, 38. 193-6, 1996.

JAKABI, M.; BUZZO, A.A.; RISTORI, C.A.; TAVECHIO, A.T.; SAKUMA, H.; PAULA, A.M.R.; GELLI, D.S. Observações Laboratoriais sobre surtos alimentares de

*Salmonella* sp ocorridos na Grande São Paulo no período de 1994 a 1997. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.**, 58:47-51, 1999.

KAKU, M.; PERESI, J.T.M.; TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; BATISTA, A.B.; CASTANHEIRA, I.A.Z.; GARCIA, G.M.P.; IRINO, K.; GELLI, D.S. Surto alimentar por *Salmonella* Enteritidis no noroeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 29:127-131, 1995.

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

KELLER, L.H.; BENSON, C.E.; KROTEC, K.; ECKROADE, R.J. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. **Infect. Immun.**, 63: 2443-2449, 1995.

KELLEY, T.R.; PANCORBO, O.C.; MERKA, W.C.; BARNHARTS, H.M. Antibiotic resistance of bacterial litter isolates. **Poult. Sci.**, 77: 243-247, 1998.

KONEMAN, E.W. **Color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 5 ed. Philadelphia: Lippincott, 1997. p. 500-530.

LIN, A.W.; USERA, M.A.; BARRETT, T.J.; GOLDSBY, R.A. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella* enteritidis. **J Clin Microbiol**, 34: 870-876, 1996.

LINDSAY, J.A. Chronic sequelae of foodborne disease. **Emerg. Infect. Dis.**, 3:443-452, 1997.

LINDSTEDT, B.; HEIR, E.; VARDUND, T.; KAPPERUD, G. Fluorescent amplified-fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars and comparison with pulsed-field gel electrophoresis typing. **J. Clin. Microbiol.**, 38:1623-1627, 2000.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical tests for identification of medical bacteria.** 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 912p.

MAHON, C.R.; MANUSELIS, G. **Textbook of diagnostic microbiology.** 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2000. p.463-514.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K.E.; SPIETH, J.; CLIFTON, S.W.; LATREILLE, P.; COURTNEY, L.; PORWOLLIK, S.; ALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; NGUYEN, C.; SCOTT, K.; HOLMES, A.; GREWAL, N.; MULVANEY, E.; RYAN, E.; SUN, H.; FLOREA, L.; MILLER, W.; STONEKING, T.; NHAN, M.; WATERSTON, R.; WILSON, R.K. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. **Nature**, 413:852-856, 2001.

MCCLELLAND, M.; SANDERSON, K.E.; CLIFTON, S.W.; LATREILLE, P.; PORWOLLIK, S.; SABO, A.; MEYER, R.; BIERI, T.; OZERSKY, P.; MCLELLAN, M.; HARKINS, C.R.; WANG, C.; NGUYEN, C.; BERGHOFF, A.; ELLIOTT, G.; KOHLBERG, S.; STRONG, C.; DU, F.; CARTER, J.; KREMIZKI, C.; LAYMAN, D.; LEONARTALI, J.; DANTE, M.; DU, F.; HOU, S.; LAYMAN, D.; LEONARD, S.; SUN, H.; FULTON, L.; NASH, W.; MINER, T.; MINX, P.; DELEHAUNTY, K.; FRONICK, C.; MAGRINI, V.; NHAN, M.; WARREN, W.; FLOREA, L.; SPIETH, J.; WILSON, R.K. Comparison of genome degradation in Paratyphi A and Typhi, human-restricted serovars of *Salmonella enterica* that cause typhoid. **Nature Genetics**, 36:1268-1274, 2004.

MILLER, S.I.; HOHMANN, E.L.; PEGUES, D.A. *Salmonella* (including *Salmonella typhi*). In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases.** . 4.ed. New York, Churchill Livingstone, 1995. v.2, p.2013-2033.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. **Acta Scient. Vet.** 32:47-51, 2004.

NEGRETE, I.D.R.A. Sorotipagem, fagotipagem, caracterização molecular de cepas de *Salmonella* spp. e avaliação epidemiológica de surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2004. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Londrina, 2004. 216p.

OHL, M.E.; MILLER, S.I. *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. **Annu. Rev. Med.**, 52: 259-274, 2001.

OLSEN, S.J.; BISHOP, R.; BRENNER, F.W.; ROELS, T.H.; BEAN, N.; TAUXE, R.V.; SLUTSKER, L. The changing epidemiology of *Salmonella*: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987-1997. **J. Infect. Dis.**, 183:753-761, 2001.

OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000. 254p.

PARKHILL, J.; DOUGAN, G.; JAMES, K.D.; THOMSON, N.R.; PICKARD, D.; WAIN, J.; CHURCHER, C.; MUNGALL, K.L.; BENTLEY, S.D.; HOLDEN, M.T.G.; SEBAIHIA, M.; BAKER, S.; BASHAM, D.; BROOKS, K.; CHILLINGWORTH, T.; CONNERTON, P.; CRONIN, A.; DAVIS, P.; DAVIES, R.M.; DOWD, L.; WHITE, N.; FARRAR, J.; FELTWELL, T.; HAMLIN, N.; HAQUE, A.; HIEN, T.T.; HOLROYD, S.; JAGELS, K.; KROGH, A.; LARSEN, T.S.; LEATHER, S.; MOULE, S.; Ó'GAORA, P.; PARRY, C.; QUAIL, M.; RUTHERFORD, K.; SIMMONDS, M.; SKELTON, J.; STEVENS, K.; WHITEHEAD, S.; BARREL, B.G. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. **Nature**, 413:852-856, 2001.

PAYMENT, P.; RILEY, M.S. **Resolving the Global Burden of Gastrointestinal Illness: A Call to Action**. American Academy of Microbiology. Washington, DC, 2002. Disponível em: <http://www.asmus.org>. Acesso em: 25 out. 2005.

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**, 32:477-483, 1998.

POPOFF, M.Y. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8.ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Pasteur Institute, Paris, France. 2001.

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

RABSCH, W.; ANDREWS, H.L.; KINGSLEY, R.A.; PRAGER, R.; TSCHÄPE, H.; ADAMS, L.G.; BÄUMLER, A.J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and its host-adapted variants. **Infect. Immun.**, 70:2249-2255, 2002.

RAJASHEKARA, G.; KOEUTH, T.; NEVILE, S.; BACK, A.; NAGARAJA, K.V.; LUPSKI, J.R.; KAPUR, V. SERE, a widely dispersed bacterial repetitive DNA element. **J Med Microbiol**, 47: 489-497, 1998.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRIKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **J. Clin. Microbiol.**, 43:3615-3623, 2005.

REEVES, M.W.; EVINS, G.M.; HEIBA, A.A.; PLIKAYTIS, B.D.; FARMER III, J.J. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **J. Clin. Microbiol.**, 27:313-320, 1989.

RODRIGUES, D.P. **Vigilância de *Salmonella***. In: Capacitação e Controle de *Salmonella* - WHO - Global *Salmonella* Surveillance. Aula ministrada na FIOcruz, Rio de Janeiro, 26 de set. de 2005.

RODRÍGUEZ, M.; DIEGO, I.; MENDOZA, M.C. Extraintestinal salmonellosis in a general hospital (1991 to 1996): relationships between *Salmonella* genomic groups and clinical presentations. **J. Clin. Microbiol.**, 36:3291-3296, 1998.

ROHLF, F.J. NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis systems. Version 2. Applied Biostatistics Inc., 1998.

ROSS, I.L.; HEUZENROEDER, M.W. Discrimination within phenotypically closely related definitive types of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by the multiple amplification of phage locus typing technique. **J. Clin. Microbiol.**, 43:1604-1611, 2005.

SALYERS, A.A.; WHIT, D.D. *Salmonella* Infections. In: **Bacterial Pathogenesis - A Molecular Approach**. Washington, D.C. ASM Press, 1994. p.229-243.

SAMBROOCK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, A. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**, 2ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, 3v.

SAUNDERS, G.C.; DUKES, J.; PARKES, H.C.; CORNETT, J.H. Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Analysis. **Clin. Chem.**, 47:47-55, 2001.

SCHELD, W.M.; SANDE, M.A. Endocarditis and intravascular infections. In: MANDELL, G.L.; BENNETT, J.E.; DOLIN, R. **Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious diseases**. . 4.ed. New York, Churchill Livingstone, 1995. v.1, p.740-782.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.**, 17:14-56, 2004.

SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL, K.R.; NEVIN, K.P.; LOVLEY, D.R. Isolation, characterization, and U (VI)-reducing potential of a facultatively

anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U (VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.**, 70:2959-2965, 2004.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciência Avic.**, 4:85-100, 2002.

SOTO, S.M.; GUERRA, B.; GONZALEZ-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.**, 65: 4830-4836, 1999.

SWAMINATHAN, B.; MATAR, G.M. Molecular typing methods. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVER, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic molecular microbiology. Principles and applications.** Washington, D.C., ASM Press,.1993. p.26-50.

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. **Infec. Control Hosp. Epidemiol.**, 18:426-439, 1997.

THRELFALL, E.J.; HALL, M.L.M.; ROWE, B. *Salmonella* bacteraemia in England and Wales, 1981- 1990. **J. Clin. Pathol.**, 45:34-36, 1992.

THONG, K.; NGEOW, Y.; ALTWEGG, M.; NAVARATNAM, P.; PANG, T. Molecular analysis of *Salmonella enteritidis* by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and ribotyping. **J. Clin. Microbiol.**, 33:1070-1074, 1995.

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.**, 35:339-346, 1997.

VAAGLAND, H.; BLOMBERG, B.; KRÜGER, C.; NAMAN, N.; JUREEN, R.; LANGELAND, N. Nosocomial outbreak of neonatal *Salmonella enterica* serotype

Enteritidis meningitis in a rural hospital in northern Tanzania. **BMC Infect. Dis.**, 4:35, 2004.

VIDAL, J.E.; DA SILVA P.R.; SCHIAVON NOGUEIRA, R.; BONASSER FILHO, F.; HERNANDEZ, A.V. Liver abscess due to *Salmonella* Enteritidis in a returned traveler with HIV infection: case report and review of the literature. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, 45: 115-117, 2003.

VENKINBURGH, J.C.V.; GUNN, J.S. PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. **Infect. Immun.**, 67:1614-1622, 1999.

WEINBERGER, M.; KELLER, N. Recent trends in the epidemiology of non-typhoid *Salmonella* and antimicrobial resistance: the Israeli experience and worldwide review. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 18:513-521, 2005.

WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Res.**, 18: 7213-7218, 1990.

WIGLEY, P.; HULME, S.D.; POWERS, C.; BEAL, R.K.; BERCHIERI JR, A.; SMITH, A.; BARROW, P. Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar Pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity. **Infect. Immun.**, 73:2986-2990, 2005.

WILLIAMS, J.G.; 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**, 18: 6531-6535, 1990.

WRAY, C.; MCLAREN, I. M.; JONES, Y.E. The epidemiology of *Salmonella* Typhimurium in cattle: plasmid profile analysis of definitive phage type (DT) 204c. **J. Med. Microbiol.**, 47:483-487, 1998.