

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS SALMONELAS DE
SETE ESTADOS BRASILEIROS**

QUÉZIA MOURA DA SILVA

**DOURADOS MS
2012**

QUÉZIA MOURA DA SILVA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DAS SALMONELAS DE
SETE ESTADOS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão

Co-orientadora: Prof. Dra. Kelly Cristina da Silva Brabes

**DOURADOS MS
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S586e

Silva, Quézia Moura

Epidemiologia molecular das salmonelas de sete estados brasileiros / Quézia Moura Silva. -- Dourados, MS: UFGD, 2012.
97f. il.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Juliano Negrão
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Salmonelas não-tifoides. 2. Susceptibilidade antibiótica. 3. Epidemiologia molecular. I. Título.

CDD – 576.19

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

Agradecimentos

A Deus por me conceder a vida, saúde e sabedoria, e por me guiar nessa jornada.

Aos meus pais, Isaias e Maria Elena, pelo amor, compreensão, apoio e pelos valores a mim transmitidos.

Ao meu orientador, professor Fábio Juliano Negrão, pela oportunidade e pela confiança em mim e no meu trabalho.

À professora Kelly Cristina da Silva Brabes, pela co-orientação e pela contribuição com as correções deste trabalho.

Ao amigo e professor Nelson Luís de Campos Domingues pelo incentivo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários do laboratório de análises clínicas do HU/UFGD, especialmente à Flávia Patussi, por disponibilizarem os isolados de origem humana.

À professora Kelly Mari Pires de Oliveira, por disponibilizar isolados de origem alimentar e ambiental.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelo financiamento necessário à execução desse projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por me prestar auxílio financeiro.

À Dra. Eliane Moura Falavina dos Reis, do Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/RJ), pela realização da sorotipagem dos isolados.

À professora Joice Neves Reis Pedreira, do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (FIOCRUZ/BA), por gentilmente me receber junto à sua equipe no Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) para a realização da técnica de PFGE. Sou grata pelos ensinamentos, apoio, atenção e orientação durante o tempo em que lá estive.

À Soraia, Ana Paula, Milena, Jailton, Vívian, Luís e Eder pela ajuda no aprendizado e execução da técnica de PFGE, bem como aos demais membros da equipe (professora Leila, Diego, Eliane, Mariela, Maíra, Sheila) pela disponibilidade a ajudar, pelo carinho e companheirismo.

À Cida e à Carol, que prontamente se disponibilizaram a dividir apartamento comigo durante o tempo que estive em Salvador. Agradeço pela amizade, companhia,

pelos momentos de descontração, pelas palavras de conforto e ânimo quando me sentia desanimada, triste, aflita e com saudade da família.

A todos os demais amigos soteropolitanos, pelo carinho e acolhimento, pela força nos momentos difíceis e pelos momentos de alegria compartilhados.

Ao secretário de Pós-Graduação, Alex Fraga, pela prestatividade no atendimento.

À Lujan, técnica do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Saúde/UFGD, pela ajuda e pelo companheirismo diário no laboratório.

Às colegas de laboratório, Tiara, Fabiana, Karla, Cibelli, Regiane, Chaiane e Kesia, pelos momentos de alegria e descontração.

À amiga Adriana, pela ajuda em algumas partes do experimento, pelo companheirismo, pelas conversas e risadas, por estar sempre pronta a me ouvir nos meus momentos de angústia e sempre ter uma palavra de ânimo.

A todos os demais amigos que me colocaram em suas orações e torceram por mim durante esse período.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Isaias e Maria Elena, por ser meu esteio, pelos valiosos ensinamentos a mim transmitidos ao longo da vida, pelo exemplo de dignidade, esforço e superação, pelo amor incondicional, pela compreensão e apoio, e por acreditarem nos meus sonhos e me ajudarem a torná-los reais.

Sumário

Agradecimentos	iii
Dedicatória.....	v
Listas de figuras	viii
Listas de tabelas	ix
Listas de abreviaturas e símbolos	x
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Histórico	3
2.2 Características da bactéria	7
2.2.1 Características morfológicas	7
2.2.2 Características bioquímicas	7
2.2.3 Características fisiológicas	10
2.2.4 Parede celular	11
2.2.5 Estrutura antigênica	13
2.3 Taxonomia e nomenclatura	14
2.4 Habitat	17
2.5 Transmissão	18
2.6 Patogênese das infecções por <i>Salmonella</i> spp. em humanos.....	20
2.7 Patogênese das infecções por <i>Salmonella</i> spp. em aves	26
2.8 Características clínicas das infecções por <i>Salmonella</i> spp. em humanos	26
2.8.1 Gastroenterite.....	27
2.8.2 Bacteremia	27
2.8.3 Febre entérica	27
2.8.4 Estado de portador crônico	28
2.9 Características clínicas das infecções por <i>Salmonella</i> spp. em aves	28
2.10 Epidemiologia	29
2.11 Resistência antibiótica	32
2.12 Diagnóstico laboratorial	34

2.12.1 Bacteriologia	34
2.12.2 Sorologia por aglutinação em látex	35
2.12.3 Sorotipagem.....	35
2.13 Tipagem molecular por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	36
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
5 ANEXOS.....	58
5.1 Anexo I - Normas para Publicação do Artigo	58
5.2 Anexo II - Artigo Científico	75

Lista de figuras

Figura 1. Representação esquemática da estrutura da parede celular das salmonelas	11
Figura 2. Representação esquemática da estrutura intacta do lipopolissacarídeo	11
Figura 3. Esquema de divisão de espécies e subespécies de <i>Salmonella</i> spp.....	16
Figura 4. Representação esquemática da patogênese de <i>Salmonella</i> spp.....	22
Figura 5. Representação esquemática da secreção de fluídos dentro do lúmen intestinal como consequência da reação inflamatória decorrente da infecção por <i>Salmonella</i> spp....	24
Figura 6. Representação esquemática da disseminação sistêmica das salmonelas tifóides	25
.....	

Lista de tabelas

Tabela 1. Características bioquímicas básicas das Salmonelas.....	9
Tabela 2. Variedade de hospedeiros de sorotipos de <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	18
Tabela 3. Efeitos dos eventos genéticos nos padrões da PFGE.....	38

Lista de abreviaturas e símbolos

ABS	Ágar Bismuto Sulfito
AFLP	Análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento Amplificado
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AMP	Ampicillin
ARP	Antibiotic Resistance Pattern
AVB	Ágar Verde Brilhante
a_w	Atividade de água
CAP	Proteínas de adaptação ao frio
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CHEF	Eletroforese em Campo Elétrico Homogêneo de Contorno Estreito
CHL	Chloramphenicol
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CSP	Proteínas de choque frio
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERIC	Consenso de Repetição Intergênica de Enterobactérias
FAE	Epitélio folículo associado
GEN	Gentamicin
HE	Ágar Hektoen Entérico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
HSP	Proteínas de choque térmico
Kb	Quilobase
KCN	Cianeto de potássio
Lac ⁺	Lactose positiva
LES	Lupus Eritematoso Sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Multidrug resistance/Multidrug resistant
MG	Minas Gerais
MLST	Tipagem por Sequência de Múltiplos Loci

MLVA	Análise de Polimorfismo Numérico de Segmentos Repetitivos em Múltiplos Loci
MS	Mato Grosso do Sul
MT	Mato Grosso
NaCl	Cloreto de sódio
NAG	N-acetilglicosamina
NLM	Nódulos linfáticos mesentéricos
NOR	Norfloxacin
OFAGE	Eletroforese em Gel de Campo Alternado Ortogonalmente
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONPG	Orto-nitrofenol- β -D-galactopiranosídeo
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PFIGE	Eletroforese em Gel de Campo de Inversão Periódica
pH	Potencial hidrogeniônico
PR	Paraná
RAPD	Amplificação Randômica de DNA Polimórfico
REP	Palíndromo Extragênico Repetitivo
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição
Sac ⁺	Sacarose positiva
SC	Santa Catarina
SCV	Vacúolo contendo <i>Salmonella</i>
SIF	Filamento <i>Salmonella</i> induzido
SP	São Paulo
SPI-1	Ilha de patogenicidade 1 da <i>Salmonella</i>
SPI-2	Ilha de patogenicidade 2 da <i>Salmonella</i>
SPI-7	Ilha de patogenicidade 7 da <i>Salmonella</i>
SS	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i>
SXT	Trimethoprim-sulfamethoxazole
TET	Tetracycline
TLR-4	Receptor toll-like do tipo 4
TLR-5	Receptor toll-like do tipo 5
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
T3SS	Sistema de Secreção Tipo III

VAFGE	Eletroforese Vertical em Gel de Campo Alternado
XLD	Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato
β	Beta
mL	Mililitro
U	Unidade
γ	Gama
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
$^{\circ}$	Graus
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
+	Positivo
>	Maior
\geq	Maior ou igual
<	Menor
\leq	Menor ou igual
%	Porcentagem

Resumo

Foi caracterizada a diversidade fenotípica e genotípica de 87 isolados de *Salmonella* spp. coletados de março de 2010 a março de 2011, em sete estados brasileiros. Os isolados foram submetidos a sorotipagem, teste de susceptibilidade antibiótica por micro-diluição em caldo, e Eletroforese em Gel de Campo Pulsado. Dezesesseis sorotipos foram identificados, e *Salmonella* sorotipos Enteritidis (19,54%), Infantis (16,09%), Minnesota (13,79%), Corvallis (12,64%), Schwarzengrund (11,49%) and Typhimurium (8,05%) foram, respectivamente, os mais comuns. *Salmonella* sorotipos Infantis e Typhimurium foram isoladas de fezes humanas e de frangos. Setenta e um isolados (81,61%) foram resistentes a um ou mais antibióticos. As maiores taxas de resistência foram registradas contra sulfametoxazol-trimetoprim (63,22%), tetraciclina (29,89%) e ampicilina (18,39%). Padrões de resistência a múltiplas drogas foram observados em 11 isolados de frango. *Salmonella* sorotipos Enteritidis, Infantis, Minnesota, Typhimurium, Heidelberg and Schwarzengrund foram relacionadas a padrões de PFGE distribuídos em diferentes estados, sugerindo a existência de uma origem comum e a circulação desses clones entre tais regiões. *Salmonella* sorotipo Infantis compartilhou o mesmo padrão clonal entre isolados de fezes humanas e frangos. Estes resultados indicam a ampla distribuição de sorotipos, padrões clonais e de resistência antibiótica entre os isolados, com frequente exposição de susceptíveis a contaminações e re-contaminações. Além disso, a co-circulação de isolados com diferentes padrões de resistência pode favorecer a aquisição de genes, permitindo o surgimento de cepas multi-resistentes. A compreensão sobre origem, rota de transmissão e relações entre os hospedeiros de *Salmonella* spp. permite a identificação precoce de surtos e potenciais padrões de resistência, possibilitando a adoção de medidas de prevenção e controle de surtos.

Abstract

We characterized the phenotypic and genotypic diversity of 87 *Salmonella* spp. isolates collected from March 2010 to March 2011 in seven Brazilian States. The isolates were submitted to serotyping, to antibiotic susceptibility test by broth microdilution, and Pulsed Field Gel Electrophoresis. Sixteen serotypes were identified, and *Salmonella* serotypes Enteritidis (19,54%), Infantis (16,09%), Minnesota (13,79%), Corvallis (12,64%), Schwarzengrund (11,49%) and Typhimurium (8,05%) were, respectively, the most common. *Salmonella* serotypes Infantis and Typhimurium were isolated from human stool and poultry's. Seventy one isolates (81,61%) were resistant to one or more antibiotics. The highest resistance rates were registered against trimethoprim-sulfamethoxazole (63,22%), tetracycline (29,89%) and ampicillin (18,39%). Multidrug resistance patterns were observed in 11 poultry isolates. *Salmonella* serotypes Enteritidis, Infantis, Minnesota, Typhimurium, Heidelberg and Schwarzengrund were related to PFGE patterns spread in different States, suggesting the existence of a common origin and the circulation of these clones among these regions. *Salmonella* serotype Infantis shared the same clonal pattern among isolates from stool and poultry's samples. These results indicate the wide distribution of serotypes, clonal patterns and antibiotic resistance among the isolates, with frequent exposure of susceptible to contaminations and recontaminations. Moreover, the co-circulation of isolates with different resistance patterns can favor the resistance genes acquisition, allowing the emergence of multidrug-resistance strains. The understanding about origin, route transmission and relation among *Salmonella* spp. hosts allows the precocious identification of outbreaks and of potential resistance patterns, enabling the use of preventive actions and the control of the outbreaks.

1 INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos representam uma importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo e, durante as últimas décadas, têm aumentado sua incidência. A globalização no processo de fornecimento alimentar contribui para a distribuição mundial dessas doenças, caracterizando-as como um sério problema de saúde pública. Anualmente, cerca de 1,8 milhões de crianças vão a óbito devido a doenças diarreicas, das quais uma grande parte é de origem alimentar. Apesar de esses óbitos ocorrerem, em sua maioria, em países subdesenvolvidos, as doenças de origem alimentar não se limitam a esses países, nem tão pouco a crianças. Nos Estados Unidos, aproximadamente 76 milhões de enfermidades, 325 mil hospitalizações e 5 mil mortes ocorrem a cada ano, devido a infecção de origem alimentar (FLINT et al., 2005; STEIN et al., 2007; SENIOR, 2009).

As salmonelas estão entre os principais patógenos causadores dessas doenças, levando à ocorrência de milhões de doenças diarreicas e milhares de óbitos, por ano, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (HENDRIKSEN et al., 2009). Estima-se que, anualmente, no mundo, ocorram 93,8 milhões de casos de gastroenterite por salmonelas não-tifóides, dos quais 155.000 resultam em óbito. Desses casos, estima-se que 80,3 milhões sejam de origem alimentar (MAJOWICZ et al., 2010). Somente nos Estados Unidos, as salmonelas não-tifóides causam, anualmente, cerca de 1 milhão de doenças de origem alimentar, mais de 19 mil casos de hospitalização e, aproximadamente, 380 óbitos, com custos médicos diretos estimados em cerca de 365 milhões de dólares (CDC, 2011¹; CDC, 2011²).

No Brasil, houve uma diminuição no número de casos de infecções humanas nos últimos anos. Contudo, a incidência de isolados de origem alimentar e ambiental apresentou um significativo aumento. No ano de 2010, foram registrados 376 isolados humanos, 7.970 de origem alimentar, 1.996 de alimentos de origem animal, 6.283 ambientais e 1.674 de animais (WHO, 2011).

Contudo, a situação vem se agravando com o aumento da resistência antibiótica por essas bactérias. O uso de antibióticos em humanos e em animais destinados à alimentação tem selecionado bactérias resistentes, que podem ser facilmente disseminadas, tendo em vista o atual sistema de produção e distribuição em massa de alimentos. A elevada taxa de

resistência contribui para o estabelecimento de formas invasivas da infecção e dificulta o tratamento, levando ao aumento da morbidade e da mortalidade (SU et al., 2004; DUPONT, 2007; MAJOWICZ et al., 2010). No Brasil, estudos evidenciam significativas taxas de resistência e, inclusive, multi-resistência em isolados de origem humana, animal e alimentar (FERNANDES et al., 2009; VAZ et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011).

Nesse âmbito, o esclarecimento da origem do patógeno e da sua disseminação através da cadeia de transmissão é de fundamental importância para a adoção de medidas de profilaxia e controle, que visem à diminuição da incidência e de surtos. Para tanto, as bactérias podem ser separadas com base na caracterização fenotípica (ex.: sorotipagem e perfil de susceptibilidade antibiótica) e/ou genotípica – através de técnicas de tipagem molecular. Dentre estas últimas, destaca-se a Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (do inglês, PFGE), considerada padrão-ouro para a tipagem bacteriana, devido ao seu alto poder discriminatório, sua ampla aplicabilidade e sua concordância epidemiológica (BARRET; GERNER-SMIDT; SWAMINATHAN, 2006; FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007).

Devido ao uso de enzimas de restrição de corte raro e um sistema de eletroforese com correntes elétricas alternadas, essa técnica permite a separação de grandes fragmentos de uma molécula de DNA cromossomal completa, gerando padrões específicos da estirpe (FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007; IMEM; RIDHA; MAHJOUR, 2012) e atuando, assim, como uma importante ferramenta em contextos epidemiológicos a curto e longo prazo e a níveis geográficos locais ou, até mesmo, continentais (LACONCHA et al., 2000; KAY et al., 2007; PANG et al., 2007; HOELZER et al., 2011).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Os primeiros registros de infecção por bactérias do gênero *Salmonella* spp. provavelmente foram feitos por Hipócrates, quando descreveu sintomas que incluíam a febre, e pelo médico romano, Antonio Musa, responsável pelo tratamento do imperador Augusto. A descrição dos sintomas que levaram Alexandre o Grande a óbito em 323 a.C., feita por Arrian e Plutarch, também deixou a suspeita de que Alexandre teria morrido de febre tifóide (HUCKSTEP, 1962 apud SARAVIA-GOMES; FOCACCIA, 1991, p. 401; OSLER, 1892 apud CUNHA, 2004, p. 62-63).

Entre 1607 e 1624, somente nos Estados Unidos, foram relatados mais de 6.000 casos de morte pela doença (WHO, 1975 apud EZEAGWUANA et al., 2011). Em 1659, o médico inglês Thomas Willis descreveu os sintomas da febre tifóide, diferenciando-a de muitas outras doenças similares e reconhecendo-a como doença específica. Em 1826, o médico francês Trousseau estudou minuciosamente a inflamação das placas de Peyer e de Brunner e verificou a especificidade das lesões anátomo-patológicas da doença, distinguindo-a de outras enfermidades intestinais. Três anos depois, Pierre Louis confirmou seus estudos, descrevendo as lesões *post-mortem* deixadas pela febre tifóide, principalmente a hipertrofia e a ulceração das placas de Peyer (HUCKSTEP, 1962 apud SARAVIA-GOMES; FOCACCIA, 1991, p. 401).

A partir de 1856, trabalhos publicados pelo médico inglês William Budd demonstraram que o agente causador da febre tifóide era expelido pelas fezes e que o leite e a água eram importantes fontes de infecção (DOWLING, 1977 apud EDITORIAL, 1978, p. 741). Como medida de controle, no ano de 1875, foi realizado um melhoramento no sistema de fornecimento de água doméstica, que levou a uma redução do número de casos da doença até o fim da década de 1880 (GREENWOOD, 1935 apud HARDY, 2004, p. 541).

Justamente no primeiro ano desta década – 1880 – foi feita a primeira observação do agente etiológico em cortes histopatológicos de baço e nódulos linfáticos mesentéricos de um paciente vitimado pela febre tifóide, pelo bacteriologista alemão Karl Joseph Eberth, que nomeou o microrganismo como bacilo de Eberth ou *Eberthella typhi*. Quatro anos

depois, o bacilo foi isolado em meio de cultura pelo bacteriologista George Theodor August Gaffky (HUCKSTEP, 1962 apud SARAVIA-GOMES; FOCACCIA, 1991, p. 401).

Em 1886, o veterinário Daniel Elmer Salmon e o epidemiologista e patologista Theobald Smith, ambos americanos, encontraram a bactéria em porcos acometidos por uma doença conhecida como cólera suína (“hog cholera”), dando ao microrganismo o nome de “*hog-cholerabacillus*” (ACHARD; BENSUADE, 1896 apud GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000, p. 1).

Gaertner, em 1888, confirmou, provavelmente pela primeira vez em laboratório, um surto de salmonelose ao isolar *Bacterium enteritidis* (posteriormente chamada de *Salmonella enteritidis*) da carne de uma vaca recém-abatida e dos órgãos de um homem que estava entre 58 pessoas que ingeriram a carne e desenvolveram um quadro de gastroenterite (TOPLEY; WILSON, 1929 apud BELL; KYRIAKIDES, 2002, p. 1; GÄRTNER, 1888 apud MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006, p. 58). Ainda nesse ano, ocorreu o primeiro relato de isolamento da bactéria em aves, quando Klein isolou *Bacterium gallinarum* de frangos acometidos por tifo aviária em um surto na Inglaterra (KLEIN, 1889 apud POPPE, 2000, p. 107).

No ano de 1896, Almroth E. Wright, na Inglaterra, e Richard Pfeiffer e Wilhelm Kolle, na Alemanha, desenvolveram a primeira vacina tifóide para humanos (PFEIFFER; KOLLE, 1896; WRIGHT; LEISHMAN, 1900 apud IVANOFF; LEVINE; LAMBERT, 1994, p. 957). Concomitantemente, se desenvolvia um novo teste para o diagnóstico do bacilo tifóide – o sorodiagnóstico de Widal – a partir da constatação de que o bacilo aglutinava na presença de soro de animal ou humano imunizado (WIDAL; SICARD, 1896 apud IVANOFF; LEVINE; LAMBERT, 1994, p. 957).

Quatro anos depois, Rettger descreve a pulrose, uma septicemia de pintinhos, causada pelo *Bacterium pullorum*, posteriormente chamada de septicemia fatal de pintinhos ou diarreia branca (RETTGER, 1900 apud POPPE, 2000, p. 107).

Ainda em 1900, o cientista francês Joseph Léon Lignières sugere uma mudança de nomenclatura, dando ao bacilo o nome de *Salmonella*, como homenagem a Salmon (TOPLEY; WILSON, 1929; D’Aoust, 1989 apud BELL; KYRIAKIDES, 2002, p. 1).

Durante as primeiras cinco a seis décadas de 1900, os principais relatos de salmonelose eram sobre *Salmonella* sorotipo Typhi, tendo o homem como hospedeiro específico (MANDAL, 1979 apud POPPE, 2000, p. 107). A adoção de medidas de melhoramento sanitário nos países desenvolvidos possibilitou o declínio da doença causada

por esse sorotipo; contudo houve uma ampla disseminação e aumento da prevalência de tifoze aviária e pulorose em galinhas e perus causando sérios prejuízos à indústria aviária (RETTGER, 1909; HEWITT, 1928; SCHAFFER et al., 1928; RANTA; DOLMAN, 1947; EDWARDS, 1958; BYNOE; YURACK, 1964; NICOLLE, 1964; SEELIGER; MAYA, 1964 apud POPPE, 2000, p. 107; TAUXE, 1999).

Nessa época, iniciou-se o emprego da bacteriologia como uma importante ferramenta na confirmação das possíveis origens de infecção e na compreensão do status de portador, bem como na provisão de uma base diagnóstica, com o sorodiagnóstico de Widal, o qual se tornou o teste padrão para a evidência de contato prévio com a bactéria (TOPLEY; WILSON, 1936; HENDERSON, 1976 apud BARROW, 1993, p. 654).

Mas um grande avanço no diagnóstico ainda estava por vir, com a descoberta dos antígenos flagelar H e somático O, por Weil e Felix, em 1918, que levou ao desenvolvimento de um esquema de sorotipagem, por White e Kauffmann, em 1920, designando um sistema de classificação para *Salmonella* spp., que permitiu uma melhor compreensão da epidemiologia dessas infecções (WEIL; FELIX, 1918 apud MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006, p. 59).

A combinação dos métodos bacteriológicos com medidas de controle regidas por órgãos governamentais e a introdução da vacina contra *Salmonella* sorotipo Gallinarum, em 1950, resultaram na diminuição drástica das salmoneloses aviárias entre as décadas de 1950 e 1960 em países desenvolvidos, sendo que, após alguns anos, a doença pôde ser completamente extinguida em alguns desses países (BARROW, 1993).

Entretanto, a partir de 1940 verificou-se um crescente aumento de isolados de sorotipos de *Salmonella* spp. não-tifóide não específica de humanos e de animais, tais como *Salmonella* sorotipo Typhimurium e *Salmonella* sorotipo Enteritidis, que permanecem até hoje como os sorotipos mais isolados de humanos e de animais (GALTON et al., 1964; GUTHRIE, 1992 apud POPPE, 2000, p. 108).

Em 1952, os antibióticos foram introduzidos como suplemento alimentar na criação de suínos debilitados, na Grã-Bretanha e nos Estados Unidos (WORDEN; BUNYAN, 1952 apud HARDY, 2004, p. 543). Dentro de uma década, os antibióticos já estavam sendo comumente utilizados como suplemento alimentar, e as consequências desse uso já se evidenciaram em meados dos anos 1960, com a constatação de que isolados de *Salmonella* sorotipo Typhimurium resistentes aos antibióticos estavam sendo disseminados pelo país, por bezerros. Porém, a maior gravidade do problema foi notada em 2000, quando

se iniciou a disseminação desses isolados entre as infecções humanas (ANDERSON; LEWIS, 1965 apud HARDY, 2004, p. 543).

No Brasil, até o final da década de 1890 a evolução benigna da febre tifóide dificultava a comprovação anátomo-patológica da doença, impedindo a precisão no diagnóstico, principalmente no que diz respeito ao diagnóstico diferencial em relação à malária. Nessa época, os médicos diagnosticavam as chamadas “febres paulistas” como malária; porém a ausência de formas típicas de malária nas regiões acometidas tornava o diagnóstico inviável (RELATÓRIO DO INSTITUTO BACTERIOLÓGICO, 1894 apud BENCHIMOL, 2003, p. 36).

Em 1894, Adolpho Lutz, inconformado com a situação, decidiu observar a clínica dos pacientes, avaliando a doença como febre tifóide. Ficou, então, evidenciado que as chamadas “febres paulistas” nada mais eram que casos de febre tifóide (LUTZ, 1936 apud TEIXEIRA, 2007, p. 142).

Enfrentando a oposição de muitos médicos, em 1897, Lutz conseguiu isolar o bacilo em fezes de pacientes e enviou três culturas do bacilo isolado para Eberth, sendo o diagnóstico reafirmado pelo mesmo. Lutz ainda preparou uma coleção anátomo-patológica das autópsias realizadas, mostrando, definitivamente, que se tratava da febre tifóide (LUTZ, 1936 apud TEIXEIRA, 2007, p. 143).

Acompanhando o cenário mundial, a partir de 1940 registrou-se no país o declínio das infecções por *Salmonella* sorotipo Typhi e o aumento de infecções por salmonelas não-tifóides (TAUNAY et al., 1996). Entre 1982 e 1991, *Salmonella* sorotipo Typhimurium foi o sorotipo mais isolado de infecções de origem alimentar, tendo a maionese caseira como principal fonte de infecção (HOFER; REIS, 1994).

No setor avícola, de 1962 a 1971, os sorotipos mais frequentes foram, respectivamente, *Salmonella* sorotipos Pullorum, Gallinarum e Derby, seguidos por *Salmonella* sorotipos Oranienburg, Typhimurium e Anatum. Entre 1972 e 1981, *Salmonella* sorotipos Pullorum e Gallinarum foram os mais prevalentes, seguidos por *Salmonella* sorotipos Derby, Oranienburg, Typhimurium e Enteritidis. Já de 1982 a 1991, *Salmonella* sorotipo Typhimurium se tornou o sorotipo mais prevalente, seguido por *Salmonella* sorotipos Gallinarum, Heidelberg, Enteritidis, Infantis, Pullorum e Hadar (HOFER; SILVA FILHO; REIS, 1997).

A partir de 1993, se tornaram frequentes as ocorrências de *Salmonella* sorotipo Enteritidis tanto de origem humana quanto não-humana, e os surtos foram relacionados,

principalmente, ao consumo de alimentos contendo ovos crus ou semi-crus (PERESI et al., 1998; SILVA; DUARTE, 2002).

Em 19 de setembro de 1994, foi instituído o Programa Nacional de Sanidade Avícola – Portaria 193 – estabelecendo normas de controle e/ou erradicação das principais doenças aviárias (BRASIL, 1994); e em 23 de janeiro de 1995, foram aprovadas alterações para análises de carcaça de aves e pesquisa de *Salmonella* spp. (BRASIL, 1995).

No período de 1996 a 1999, foi registrado o surgimento dos primeiros isolados de *Salmonella* sorotipo Enteritidis, tanto de origem humana quanto não-humana, resistentes a antibióticos, contribuindo para a manutenção deste sorotipo como um dos mais prevalentes no Brasil (TAVECHIO et al., 1999 apud SILVA; DUARTE, 2002).

2.2 Características da bactéria

2.2.1 Características morfológicas

As salmonelas são bacilos Gram negativos medindo 0,7-1,5 μm de largura por 2,0-5,0 μm de comprimento, não formadores de esporos nem de cápsula e móveis pela presença de flagelos peritríqueos, com exceção de *Salmonella* sorotipos Gallinarum e Pullorum e de isolados imóveis resultantes de disfunção flagelar. Algumas estirpes podem produzir fímbrias, mas a maioria das estirpes de *Salmonella* sorotipo Paratyphi A e algumas de *Salmonella* sorotipos Paratyphi B, Typhi e Typhimurium são não-fimbriadas (CAFFER; TERRAGNO, 2001; D'AOUST; MAURER, 2007; PARIJA, 2009).

2.2.2 Características bioquímicas

As salmonelas são anaeróbias facultativas e quimiorganotróficas, e têm a capacidade de metabolizar nutrientes tanto pela via respiratória quanto pela via fermentativa (D'AOUST; MAURER, 2007).

Apesar de apresentarem características bioquímicas básicas, como mostrado na tabela 1, a grande variabilidade genética dessas bactérias, devido a mutações e trocas conjugativas de plasmídeos intra e inter-gênero, tem implicado na manifestação de perfis bioquímicos atípicos. Diversos estudos já relataram a ocorrência de estirpes de *Salmonella* spp. portadores de plasmídeos que codificam enzimas que permitem a fermentação de

lactose (isolados lac⁺) e de sacarose (isolados sac⁺) (KUMAR; SURENDRAN; THAMPURAN, 2009). Na década de 70, por exemplo, Falcão et al. (1975) descreveu uma variedade endêmica de *Salmonella* spp. portadora do plasmídeo lac⁺, resistente a múltiplos antibióticos, na cidade de São Paulo. Outros achados atípicos, incluem estirpes incapazes de descarboxilar lisina (MORITA et al., 2006; YAMASAKI et al., 2007), produtoras de urease (FARMER III et al., 1975) e de indol, e de fácil crescimento na presença de KCN (D'AOUST; MAURER, 2007).

Tabela 1 – Características bioquímicas básicas das Salmonelas

Teste	Resultado	Exceções
Crescimento na presença de cianeto de potássio (KCN)	-	
Metabolismo de glicose	Fermentação	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
	Produção de gás	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
Produção de	Arginina diidrolase	+
	Catalase	-
	Citocromo oxidase	-
	Gelatinase	-
	H ₂ S	+ <i>Salmonella</i> sorotipos Paratyphi A e Choleraesuis e alguns outros sorotipos
	Indol	-
	Lisina descarboxilase	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Paratyphi A
	Nitrato redutase	+
	Ornitina descarboxilase	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
	Fenilalanina desaminase	-
	Urease	-
	α -glutamil transferase	-
Fermentação de	Adonitol	-
	Arabinose	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
	Dulcitol	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
	Lactose	-
	Maltose	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
	Manitol	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
	Rhamnose	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
	Sacarose	-
	Salicina	-
	Sorbitol	+ <i>Salmonella</i> sorotipo Typhi
Utilização de	Citrato de sódio	+ <i>Salmonella</i> sorotipos Typhi e Paratyphi

Fonte: Baseada em GRIMONT; GRIMONT; BOUVET, 2000; ELLERMEIER; SLAUCH, 2006; PARIJA, 2009; WINN; KONEMAN, 2010.

2.2.3 Características fisiológicas

As salmonelas encontram na temperatura de 37°C e na faixa de pH entre 6 e 8, as condições ideais para o seu crescimento e sobrevivência (PARIJA, 2009). Todavia, estes micro-organismos têm uma grande capacidade de adaptação a condições ambientais extremas, o que se confirma por estudos que demonstram a sobrevivência dessas bactérias em temperaturas entre 2°C (RADKOWSKI, 2002) e 90°C (SHACHAR; YARON, 2006), e a valores de pH entre 2,3 e 9,5, com crescimento entre 20°C e 40°C (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002) e a partir de um pH de 4,5 (BELL; KYRIAKIDES, 2002; MIGEEMANATHAN et al., 2011; VIALA et al., 2011).

Para sobrevivência e crescimento em baixas temperaturas, as salmonelas sintetizam um conjunto de proteínas chamadas Proteínas de Choque Frio (CSP) ou então as Proteínas de Adaptação ao Frio (CAP) (RON, 2006). Já sob condições de altas temperaturas, as salmonelas sintetizam as chamadas Proteínas de Choque Térmico (HSP) (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002).

Quando submetidas a condições ácidas, as bactérias reagem ativando enzimas do tipo aminoácido descarboxilase (VIALA et al., 2011) ou então um sistema proteico, chamado Sistema Regulatório de Duplo Componente PhoP-PhoQ (BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998; GROISMAN, 2001), que promovem a regulação do pH (MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002). Por outro lado, sob fortes condições alcalinas, as bactérias catabolizam aminoácidos, com a subsequente produção de produtos ácidos que revertem a alcalinização (SAMPATHKUMAR; KHACHATOURIANS; KORBER, 2004).

Em relação à atividade de água (a_w), o potencial de crescimento da *Salmonella* spp. se inicia a partir de valores de 0,93, ocorrendo variações dependendo do sorotipo, do substrato, da temperatura e do pH. Concentrações de cloreto de sódio (NaCl) de aproximadamente 1,8% desempenham atividade bacteriostática sobre a bactéria, enquanto concentrações maiores, geralmente entre 3 e 4%, inibem completamente a sua presença. Contudo, a tolerância a sais aumenta conforme o aumento de temperatura (BHUNIA, 2008; SHRESTHA et al., 2011).

2.2.4 Parede celular

Assim como em outros bacilos Gram-negativos, a parede celular das salmonelas é revestida por uma camada complexa de lipopolissacarídeo – LPS – (Figura 1). Esta estrutura atua como uma barreira hidrofóbica, limitando a entrada de substâncias nocivas, tais como sais biliares, enzimas digestivas e certos antibióticos, além de permitir a evasão da bactéria frente ao sistema imunológico do hospedeiro (BAYSTON; COHEN, 1990).

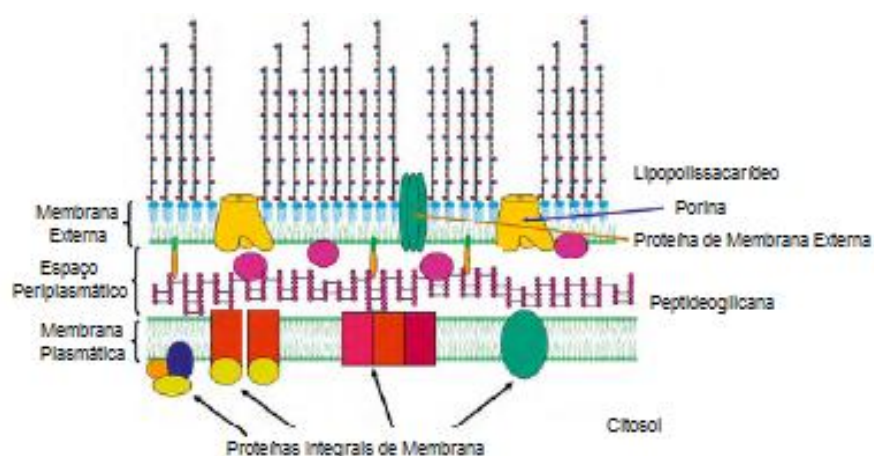


Figura 1 – Representação esquemática da estrutura da parede celular das salmonelas
Fonte: Adaptada de HOLST; MORAN; BRENNAN, 2009.

O LPS é constituído por três regiões bem definidas (Figura 2): uma região distal conhecida como polissacarídeo O (ou antígeno O), um oligossacarídeo central (core R) e uma região interna conhecida como lipídio A (ou endotoxina) (LEIVE, 1973).

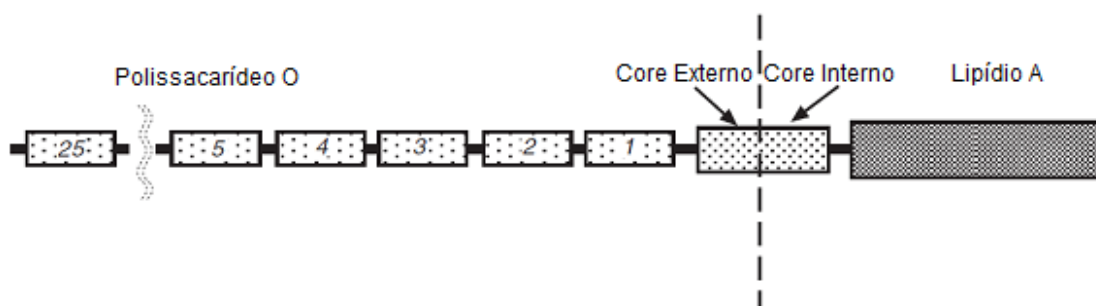


Figura 2 – Representação esquemática da estrutura intacta do lipopolissacarídeo
Fonte: Adaptada de RYCROFT, 2000.

O polissacarídeo O é formado pela repetição de 25 a 40 unidades de oligossacarídeos, compostos por 2 a 6 monossacarídeos cada, que comportam distintas unidades de resíduos de carboidrato, as quais exibem propriedades antigênicas exclusivas. O sorotipo da bactéria é determinado por estes determinantes antigênicos, também conhecidos como fatores O (BAYSTON; COHEN, 1990; RYCROFT, 2000). Esta é a região mais imunogênica do LPS, visto que o polissacarídeo O é o mediador da evasão da imunidade inata do hospedeiro, contribuindo para o aumento da sobrevivência da bactéria (DUERR et al., 2009).

A presença de uma sequência completa de unidades de oligossacarídeos – LPS na forma S – confere à bactéria uma característica morfo-colonial “lisa”. Já uma sequência incompleta – LPS na forma R –, por ocorrência natural ou por mutagênese determinada em laboratório, leva à produção de colônias com superfície irregular, pelas mutantes “rugosas”, as quais são menos virulentas que as estirpes “lisas” (RYCROFT, 2000). Entretanto, a ausência do polissacarídeo O e de parte da sequência do core, resulta em bactérias intensamente rugosas (“*deep rough*”), avirulentas, susceptíveis a compostos hidrofóbicos devido à perda de grupos responsáveis pela manutenção da permeabilidade, localizados nessa região (RAETZ; WHITFIELD, 2002).

O comprimento da cadeia do antígeno O representa um importante fator de proteção da *Salmonella* spp. contra fatores anti-microbianos do hospedeiro e está fortemente associado à invasão das células hospedeiras. A estrutura completa deste antígeno atrasa o reconhecimento da bactéria por determinados receptores das células hospedeiras – os receptores Toll-like do tipo 4 (TLR-4) – retardando a ativação da imunidade inata. Além disso, estimula a secreção de proteínas efetoras do chamado Sistema de Secreção do Tipo III (T3SS), codificado por um segmento cromossômico que carrega um grupo de genes de virulência, conhecido como Ilha de Patogenicidade, mais especificamente a Ilha de Patogenicidade 1 da *Salmonella* (SPI-1) (BHUNIA, 2008; DUERR et al., 2009; HÖLZER et al., 2009).

O core R é uma estrutura composta por um grupo de 6 a 8 açúcares não-repetidos (RYCROFT, 2000). Em estirpes lisas, é subdividido em core interno – proximal ao lipídio A – e core externo – que provê um sítio de ligação ao polissacarídeo O. O core interno tende a ser bem conservado dentro de um mesmo gênero ou uma mesma família, enquanto o core externo apresenta uma maior variabilidade estrutural (RAETZ; WHITFIELD, 2002). Isolados mutantes, sem o polissacarídeo O, mas com a estrutura do core R intacta

são classificadas como Ra. Aqueles que apresentam, ainda, ausência de parte da estrutura do core R (“*deep rough*”) são classificados de Rb a Re, dependendo do sítio afetado, sendo que entre as salmonelas há dois tipos de core bem conhecidos (Ra e Rb) (BAYSTON; COHEN, 1990; OLSTHOORN et al., 1998; MANSFIELD; FORSYTHE, 2001; NIKAIDO, 2003).

O lipídio A é constituído por um dímero de N-acetilglicosamina (NAG) fosforilado, ao qual estão ligados 6 ou 7 ácidos graxos saturados, conferindo hidrofobicidade ao LPS. Esta é a região mais conservada do LPS e também a que possui a maioria de suas propriedades endotóxicas, tais como determinação da febre, ativação do complemento sérico, de cininas e do sistema de coagulação, depressão das funções do miocárdio e alteração da função dos linfócitos, além de contribuir para o desenvolvimento do choque séptico em infecções sistêmicas (GIANNELLA, 1996).

2.2.5 Estrutura antigênica

A Salmonela apresenta três antígenos principais: antígeno O (ou antígeno somático), antígeno H (ou antígeno flagelar) e antígeno Vi (antígeno de superfície).

O antígeno O é um antígeno termo-estável e álcool resistente e, como descrito anteriormente, um dos componentes da estrutura do LPS. Em sua estrutura podem ser distinguidas duas classes de epítomos específicos: os antígenos do grupo O, associados com a configuração do carboidrato central da estrutura do antígeno O; e os antígenos ancilares O, que são carboidratos adicionais à estrutura central do antígeno O. Atualmente, são descritos 67 antígenos O e seus epítomos permitem a classificação das salmonelas em 46 sorogrupos distintos (PARIJA, 2009; CDC¹, 2011).

O antígeno H é uma estrutura composta por subunidades proteicas, denominadas flagelinas, formando a porção filamentosa dos flagelos peritríqueos das salmonelas (CDC, 2008). É um antígeno gênero específico, não partilhado por outras enterobactérias, podendo ocorrer em uma das duas ou em ambas as formas, chamadas de fase 1 e fase 2. Os antígenos de fase 1 (H1) são específicos de sorotipos particulares, enquanto os de fase 2 (H2) são não-específicos, pela apresentação de diferentes subunidades de proteínas antigênicas partilhadas por diversos sorotipos (PARIJA, 2009; PUI et al., 2011).

Isolados que apresentam apenas um tipo de antígeno H são chamados de monofásicos e podem ocorrer naturalmente em alguns sorotipos (ex.: *Salmonella* sorotipos

Enteritidis, Typhi e a maioria dos sorotipos das subspécies IIIa e IV), ou podem ocorrer por inativação gênica (CDC, 2008). Todavia, a maioria dos sorotipos apresenta tanto os antígenos H1 quanto os antígenos H2, sendo assim denominados difásicos. Para a identificação completa de um sorotipo é necessária a detecção do antígeno H em ambas as fases (PARIJA, 2009).

Este antígeno apresenta propriedades termo-lábeis e de sensibilidade a álcool e ácidos (RYCROFT, 2000). É fortemente imunogênico e está associado com a formação de anticorpos logo após a infecção ou imunização (PARIJA, 2009).

O antígeno Vi é um polissacarídeo de superfície, sobrejacente ao antígeno O, presente apenas nos sorotipos Typhi, Paratyphi C e Dublin, dos quais *Salmonella* sorotipo Typhi é a mais importante. Sua presença nestes sorotipos, entretanto, não é sistemática, visto que alguns isolados podem ou não exibi-lo. Aqueles que o possuem, têm seus antígenos O encobertos e se tornam incapazes de aglutinar com o anti-soro O (GIANNELLA, 1996; PARIJA, 2009).

Este é um antígeno termo-lábil e sensível a ácido fenol hidrocloreto e hidróxido de sódio 0,5%, além de ser facilmente perdido em subculturas seriadas. É pobremente imunogênico e estimula a produção de baixos títulos de anticorpos durante a infecção, os quais desaparecem logo na convalescência. Sua persistência indica o desenvolvimento de um estado de portador crônico. Já a sua completa ausência em um caso provado de febre tifóide indica mau prognóstico (LOSONSKY et al., 1987; PARIJA, 2009; PULICKAL et al., 2009; JANIS et al., 2011).

2.3 Taxonomia e nomenclatura

As salmonelas são taxonomicamente classificadas como micro-organismos do filo *Proteobacteria*, classe *Gammaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales*, família *Enterobacteriaceae* e gênero *Salmonella* (POPOFF; LE MINOR, 2005).

Desde os primeiros isolamentos de microrganismos do gênero *Salmonella* spp., muitas mudanças ocorreram em sua nomenclatura. De início, a nomenclatura era aplicada em conformidade à doença (ex.: *Salmonella* sorotipo Typhi) ou de acordo com a relação entre doença e hospedeiro específico (ex.: *Salmonella* sorotipos Typhimurium e Choleraesuis). Com o intento de evitar confusões, os nomes dos novos isolados passaram a

ser designados pela localização geográfica de origem (ex.: *Salmonella* sorotipos London, Paris e Dublin) (GRIMONT; WEILL, 2007).

A princípio, os esquemas de taxonomia eram baseados em reações bioquímicas, até que Kauffmann, embasado no trabalho de White, propôs a identificação sorológica dos antígenos O e H em substituição aos testes bioquímicos. Esse novo esquema de identificação ficou conhecido como esquema de Kauffmann-White e, inicialmente, culminou na identificação de cinco subgêneros (I a V) bioquimicamente definidos onde cada sorotipo era considerado uma espécie separada (ex.: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella newport*) (KAUFFMANN, 1966 apud BRENNER et al., 2000; ELLERMEIER; SLAUCH, 2006; D'AOUST; MAURER, 2007). Em seguida, foi proposto, por Kauffmann e Edwards, um esquema com a discriminação de três espécies (*Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* e *Salmonella enteritidis*), no qual o grupo Arizona era considerado um gênero isolado (KAUFFMANN; EDWARDS, 1952).

Em 1973, Crosa et al. demonstraram, por hibridização DNA-DNA, a similaridade, a nível de espécie, entre todos os sorotipos e subgêneros I, II e IV de *Salmonella* spp., e todos os sorotipos de Arizona, agrupando-os, assim, em uma única espécie.

Em 1980, *Salmonella choleraesuis* aparece na Lista de Nomes de Bactérias como uma espécie de *Salmonella*. Além de ser referida como espécie, era também referida como sorotipo, o que ocasionou um novo conflito taxonômico (SKERMAN; McGOWAN; SNEATH, 1980; BRENNER et al., 2000). A confusão foi cessada com a aprovação de um único nome para espécies do gênero *Salmonella* spp. – *Salmonella enterica* –, proposto por Leon Le Minor e Michel Y. Popoff (LE MINOR; POPOFF, 1987; PENNER, 1988).

Em 1987, Le Minor e Popoff propuseram que os subgêneros de *Salmonella* spp. passassem a ser referidos como subespécies (subespécies I, II, IIIa, IIIb, IV, V e VI). O subgênero III foi dividido em IIIa e IIIb com base nas reações bioquímicas e na análise genômica. A subespécie IIIa (*Salmonella enterica* subsp. *arizonae*) inclui os sorotipos monofásicos de “Arizona” e a subespécie IIIb (*Salmonella enterica* subsp. *diarizonae*) inclui os sorotipos difásicos (LE MINOR; POPOFF, 1987).

Passados dois anos, uma análise de diferentes sorotipos de *Salmonella* spp., pela técnica de eletroforese enzimática multilocal, propôs a descrição de *Salmonella bongori* (subespécie V) como uma nova espécie, dado o seu distinto perfil genético (REEVES et al., 1989).

Conforme o atual sistema de nomenclatura utilizado pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC), fundamentado pelo esquema de Kauffman-White, o gênero *Salmonella* spp. é dividido em duas espécies (*Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*). *Salmonella enterica* é, ainda, subdividida em seis subespécies, designadas por nomes ou por números romanos (CDC¹, 2011). A figura 3 mostra a divisão do gênero *Salmonella* spp. em espécies e subespécies.

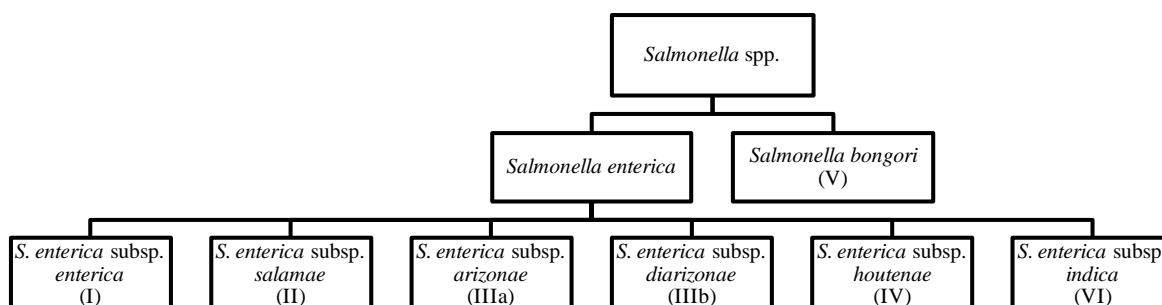


Figura 3 – Esquema de divisão de espécies e subespécies de *Salmonella* spp.

Fonte: Baseada em CDC¹, 2011

Conforme estabelecido pelo Centro de Colaboração da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1966, todos os sorotipos da subespécie I são nominados, enquanto os sorotipos das subespécies II a VI são identificados por suas fórmulas antigênicas (BRENNER et al., 2000; STEVENS; CDC¹, 2011). Atualmente, são conhecidos mais de 2610 sorotipos de *Salmonella* spp., sendo a maioria deles pertencente a *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

Os sorotipos nominados (da subespécie I) devem ter o nome do gênero, da espécie e da subespécie escritos em itálico, seguidos pelo nome do sorotipo sem itálico e com a primeira letra maiúscula. Formas abreviadas também são aceitas na designação dos sorotipos (CDC¹, 2011). Exemplos:

- Forma não abreviada:
Salmonella enterica subespécie *enterica* sorotipo Typhi
- Formas abreviadas:
Salmonella enterica sorotipo Typhi
S. enterica sorotipo Typhi
S. enterica sor. (ou ser.) Typhi
Salmonella sorotipo Typhi
Salmonella sor. (ou ser.) Typhi

A designação por fórmula antigênica é abrangente a todos os sorotipos, inclusive aos da subespécie I. A fórmula segue o seguinte formato: gênero [espaço] espécie [espaço] subespécie [espaço] antígenos O [dois pontos] antígeno H de fase 1 [dois pontos] antígeno H de fase 2 (CDC¹, 2011).

Exemplo:

Salmonella enterica subespécie *salamae* sorotipo 47:b:1,5

Muitos dos grupos O foram designados por letras e ainda são referidos desta forma; portanto, cada epítipo O pode ser designado tanto por um número quanto por uma letra. Quando múltiplos epítipos estão presentes, eles são listados subsequentemente e separados por vírgulas. Os antígenos H podem ser representados por números, ou letras, ou números e letras. Alguns destes antígenos são compostos por múltiplos fatores, os quais são separados por vírgulas (CDC¹, 2011).

Variantes de sorotipos que não expressam todos os antígenos necessários à identificação são designados por uma fórmula modificada (CDC¹, 2011):

- a) Variantes rugosas (sem expressão do antígeno O) são indicadas pela palavra “Rugosa” no local do antígeno O (ex.: sorotipo I Rugosa:i:1,2).
- b) Variantes mucóides, que expressam uma cápsula impedindo a detecção do imunológica do antígeno O, são indicadas pela palavra “Mucóide” no local do antígeno O (ex.: sorotipo Mucóide:i:1,2).
- c) Em isolados monofásicos, a ausência de um antígeno H é indicada por um sinal de menos (“-”) para a fase correspondente (ex.: sorotipo IV 48:g,z51:-).
- d) Isolados imóveis são indicados por sinais de menos (“-”) em ambas as fases (ex.: sorotipo I 4,5,12:-:-).
- e) Alguns antígenos O e H de expressão variável, fracamente reconhecidos, são indicados por parênteses (ex.: sorotipo IIIb 65(k):z).

As regras de abreviação seguem as mesmas da abreviação para os sorotipos nominados (CDC¹, 2011).

2.4 Habitat

As salmonelas habitam, primariamente, o trato intestinal de humanos, animais domésticos e selvagens, pássaros e roedores (BELL; KYRIAKIDES, 2002). Os sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* são comensais de animais de sangue quente,

enquanto os sorotipos das outras subespécies de *Salmonella enterica* e de *Salmonella bongori* são comensais de animais de sangue frio. Os sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* podem ser ainda classificados como “hospedeiro restritos” (capazes de infectar um único tipo de hospedeiro), “hospedeiro adaptados” (capazes de infectar outros hospedeiros além do hospedeiro natural) e “generalistas” (capazes de infectar diversos hospedeiros), como mostrado na tabela 1 (ELLERMEIER; SLAUCH, 2006).

Tabela 2 – Variedade de hospedeiros de sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

Classificação	Sorotipo	Hospedeiro Natural	Hospedeiros Raros
Hospedeiro Restrito	Typhi	Humanos	---
	Paratyphi A e C	Humanos	---
	Sendai	Humanos	---
	Abortusovis	Ovinos	---
	Gallinarum	Aves domésticas	---
	Typhisuis	Suínos	---
	Abortusequi	Equinos	---
Hospedeiro Adaptado	Cholerasuis	Suínos	Humanos
	Dublin	Bovinos	Humanos e ovinos
Generalista	Typhimurium	Humanos, aves domésticas, suínos, bovinos e roedores	---
	Enteritidis	Humanos, aves domésticas e roedores	Suínos e bovinos

Fonte: Adaptada de ELLERMEIER; SLAUCH, 2006, p. 126.

Entretanto, a manutenção da *Salmonella* spp. em seu habitat é dependente da sua capacidade de viver de forma comensal e ser transmitida entre hospedeiros. Para que ocorra a disseminação dessa bactéria, é necessário que a mesma seja, também, capaz de sobreviver fora do organismo hospedeiro, em ambientes naturais como solo e água. Nestes ambientes, geralmente, a bactéria não se multiplica significativamente, mas pode sobreviver por longos períodos (BELL; KYRIAKIDES, 2002; ELLERMEIER; SLAUCH, 2006).

Não obstante, a *Salmonella* spp. pode, ainda, ser encontrada em plantas e frutas, não apenas sobrevivendo, mas também se multiplicando e causando doença nessas fontes (BARAK; KRAMER; HAO, 2011; SCHIKORA et al., 2011).

2.5 Transmissão

A transmissão de *Salmonella* spp. ocorre, principalmente, pelo consumo de água e de alimentos de origem animal contaminados, como carne bovina e suína, leite e derivados,

carne de frango e ovos (BHUNIA, 2008). Ademais, tem sido crescente o número de relatos de surtos de salmonelose relacionados à ingestão de vegetais e frutas, indicando o papel destes como veículos transmissores do patógeno (HANNING; NUTT; RICKE, 2009; HRIVNIAKOVÁ et al., 2011).

O ciclo de transmissão se inicia com a contaminação do ambiente, a partir do qual ocorre a contaminação de vetores, como roedores, insetos e pássaros, que disseminam as bactérias em suas fezes por semanas e até mesmo meses. Em seguida, animais como suínos, bovinos e aves domésticas podem contrair a infecção pela via oral e permanecerem como reservatórios da bactéria. Estes podem, ainda, contaminar água e alimentos, e atuar como um elo de transmissão aos humanos (PUI et al., 2011).

Entretanto, no caso de *Salmonella* sorotipos Typhi e Paratyphi A e C, em que não há reservatório animal, a transmissão ocorre em um ciclo exclusivamente humano, onde o indivíduo infectado elimina a bactéria nas fezes, disseminando-a no ambiente, a partir do qual água e alimentos podem ser contaminados, levando à infecção de outros indivíduos. Portadores desses sorotipos podem, também, disseminá-los através de práticas inadequadas de higiene e manejo de água e alimentos (BHUNIA et al., 2009). Formas menos convencionais incluem transmissão sexual entre homens (RELLER et al., 2003) e transmissão vertical (de mãe para filho) por via transplacentária ou por via oral no momento do parto (MOHANTY et al., 2009).

Na cadeia alimentar, a contaminação pode ocorrer no início do processo de produção, no empacotamento, na distribuição ou no processamento final (MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006).

Em bovinos e suínos, portadores assintomáticos de *Salmonella* spp., a carne pode ser contaminada pelo conteúdo gastrointestinal do animal, durante o abate e o processamento, e a ingestão dessa carne mal-cozida pode levar à aquisição de uma salmonelose. Já a contaminação do leite pode se dar durante a ordenha. Para destruir a *Salmonella* spp. e outras bactérias patogênicas possivelmente presentes, o leite passa pelo processo de pasteurização. Contudo, se submetido a uma pasteurização inadequada ou se contaminado após esse processo, o leite e os produtos lácteos podem representar importantes veículos transmissores desse patógeno (WONG et al., 2002; MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006).

A contaminação de aves, geralmente, ocorre nas ninhadas, onde os filhotes adquirem o patógeno por via nasal ou cloacal e disseminam a bactéria através de alimento

ou água contaminados com material fecal. Os filhotes de aves portadoras, podem ser contaminados, precocemente, por transmissão vertical através de ovário, oviduto ou ovos infectados (KABIR, 2010). A transmissão para humanos se dá pela ingestão da carne mal-cozida, contaminada com o conteúdo gastrointestinal no momento do abate ou do processamento, assim como em bovinos e suínos (ARSENAULT et al., 2007). Além disso, a *Salmonella* spp. pode entrar nos ovos, na região do oviduto, principalmente quando a cutícula de revestimento da casca do ovo está danificada, ou permanecer na superfície externa da casca e, a partir de então, o manuseio inadequado desses ovos na preparação de alimentos pode ser causa de infecções humanas pela bactéria (FEARNLEY et al., 2011; PUI et al., 2011).

A carne pífcea, apesar de ser menos associada com casos de salmonelose em relação aos outros tipos de carne já citados, é também considerada uma importante fonte de infecção de *Salmonella* spp. para humanos. A principal rota de transmissão da bactéria aos peixes é através da água contaminada com material fecal; contudo, o uso de esterco animal, para estímulo da produção de algas, e a alimentação com ração contaminada são também fatores contribuintes à infecção desses animais. Geralmente, a bactéria coloniza a epiderme e as vísceras do peixe e, durante o processamento, se dá a contaminação da carne. Esta, por sua vez, representa um veículo de transmissão aos humanos quando ingerida crua ou mal-cozida (LOTFY et al., 2011; OLGUNOĞLU, 2012).

Frutas e vegetais também podem ser inseridos no ciclo de transmissão dessa bactéria, no qual são contaminados, comumente, pelo solo, pelo adubo, pela água utilizada para irrigação e lavagem, ou por animais. A ingestão desses produtos frescos, sem o emprego de práticas adequadas de higiene, possivelmente levará à aquisição da infecção por humanos (HANNING; NUTT; RICKE, 2009).

2.6 Patogênese das infecções por *Salmonella* spp. em humanos

As infecções por *Salmonella* spp. se iniciam com a ingestão de alimentos ou bebidas contaminados. A dose infectante necessária para o estabelecimento de uma infecção é de 10^5 a 10^{10} unidades formadoras de colônia (UFC) por grama; contudo, se ingeridas com alimento líquido, que atravessa o estômago mais rapidamente, ou com alimentos como leite ou queijo, que neutralizam a acidez estomacal, a dose infectante

diminui, assim como em indivíduos imunocomprometidos (BHUNIA, 2008; OHL; MILLER, 2001).

Em seu percurso rumo ao trato intestinal, ao atravessar o estômago, a *Salmonella* spp. dispõe de seus mecanismos adaptativos, pela liberação de enzimas aminoácido descarboxilase, para resistir ao baixo pH estomacal (SMITH, 2003; VIALA et al., 2011). Entretanto, estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que uma dose infectante menor é requerida em condições de hipocloridria em relação às condições naturais do estômago, provando a atuação do pH estomacal como uma barreira a esse patógeno (GIANNELLA; BROITMAN; ZAMCHECK, 1973; BOURRET et al., 2008).

Já no intestino, a *Salmonella* spp. exibe tropismo pelo epitélio apical do íleo, pelo ceco e pelo cólon proximal e, nessas regiões, encontra como barreira inicial a microbiota do hospedeiro. Contudo, o patógeno pode utilizar seus mecanismos de virulência, bem como se avantajam da resposta imune do hospedeiro para superar esse obstáculo (STECHEER et al., 2007; BARMAN et al., 2008). Após o rompimento da microbiota, a bactéria se adere por meio de suas fímbrias, preferencialmente, às células M (ou micropregas) do epitélio foliculo associado (FAE) sobrejacente às placas de Peyer (ALTHOUSE et al., 2003; RANK; SAEED; MURIANA, 2009). Nesse momento, cerca de 15 minutos após a entrada no organismo hospedeiro, a bactéria injeta no citoplasma da célula M proteínas efetoras secretadas pelo T3SS da SPI-1. Esses efetores ativam uma cascata de sinalização que induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, estimulando o recrutamento de neutrófilos dos vasos sanguíneos para a superfície basolateral, e provocando alterações na estrutura das junções inter-celulares que permitem a migração das células de defesa através da monocamada epitelial até à superfície apical. A ruptura dessas junções inter-celulares representa ainda uma via alternativa pela qual a *Salmonella* spp. pode obter acesso direto à lâmina própria (SANTOS et al., 2002; KÖHLER et al., 2007; HARAGA; OHLSON; MILLER, 2008; HALLSTROM; McCORMICK, 2011; Figura 4).

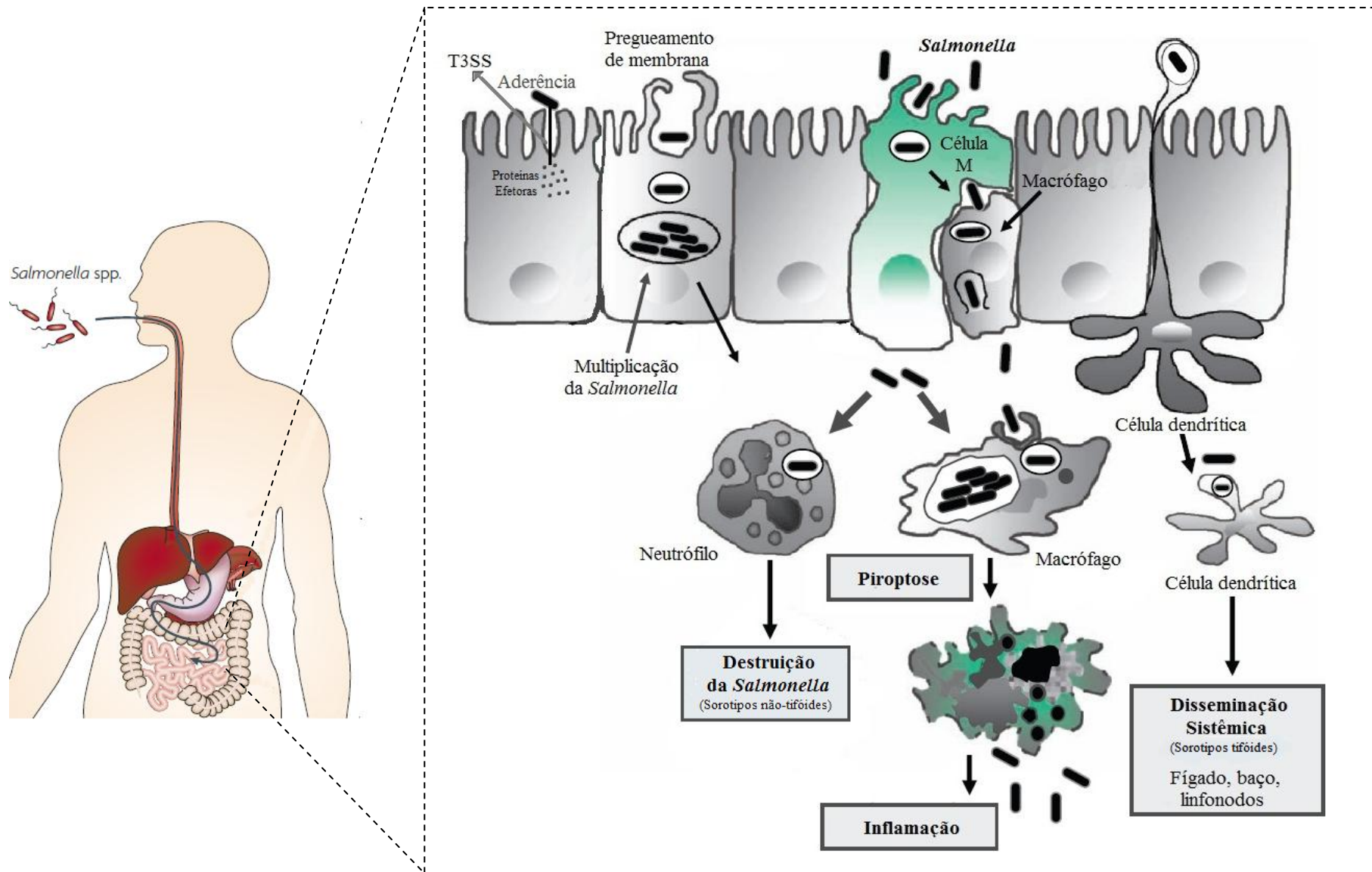


Figura 4 – Representação esquemática da patogênese de *Salmonella* spp.
 Fonte: Adaptada de BHUNIA, 2008 e HARAGA; OHLSON; MILLER, 2008.

Concomitantemente, através de mecanismos ainda não bem elucidados, a *Salmonella* spp. induz rearranjos no citoesqueleto da célula hospedeira, causando pregueamento de membrana e culminando na macropinocitose da bactéria (SCHAUSER; OLSEN; LARSSON, 2004; RADTKE et al., 2010; REIS; HORN, 2010). Seguindo a internalização, a *Salmonella* spp. permanece em um compartimento ácido, chamado Vacúolo Contendo *Salmonella* (SCV; Figura 4). Para resistir a esse ambiente hostil, ocorre a ativação de um outro tipo de T3SS, este codificado pela Ilha de Patogenicidade 2 (SPI-2), que adapta o ambiente vacuolar e promove a produção de longas estruturas de membrana, chamadas Filamentos *Salmonella*-induzidos (SIFs), que se estendem do vacúolo e se ligam a endossomos formados durante a entrada da bactéria, aumentando o tamanho do SCV e provendo espaço para a replicação bacteriana (REIS; HORN, 2010; MALIK-KALE et al., 2011).

Aproximadamente uma hora após a infecção, a *Salmonella* spp. atravessa o epitélio intestinal e, uma vez na lâmina própria, é engolfada por macrófagos ou células dendríticas ou neutrófilos. A interação entre o patógeno e a célula fagocítica, geralmente, é prejudicial a sorotipos incapazes de sobreviver dentro do ambiente do sistema linfático do hospedeiro (salmonelas não-tifóides), enquanto outros (salmonelas tifóides) encontram, dentro de macrófagos, um refúgio seguro da defesa humoral e dos neutrófilos. Para os primeiros, esse estágio representa o limite da infecção a uma gastroenterite, onde o crescimento bacteriano é controlado e a infecção permanece localizada no intestino e nos nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), ao passo que os demais podem ativar mecanismos de virulência que permitam a evasão das funções bactericidas do fagócito e, conseqüentemente, a sobrevivência e a replicação no ambiente intracelular (JONES; GHORI; FALKOW, 1994; OHL; MILLER, 2001; SANTOS; BÄUMLER, 2004; Figura 4).

Dentro dos macrófagos, a *Salmonella* spp. pode induzir, rapidamente, uma forma pró-inflamatória de morte celular, chamada piroptose, resultando na ativação de citocinas pró-inflamatórias e causando massiva morte celular nas placas de Peyer (WATSON; HOLDEN, 2010). A piroptose aumenta a reação inflamatória e pode tornar a bactéria susceptível ao ataque de neutrófilos que, ao contrário dos macrófagos, não sofrem morte celular devido à infecção por *Salmonella* spp. e, então, previnem a disseminação extra-intestinal do patógeno (SANTOS et al., 2009; Figura 4).

À medida que a reação inflamatória progride, ocorre uma massiva migração trans-epitelial de neutrófilos, causando o desprendimento epitelial da membrana basal e

favorecendo a secreção de fluídos dentro do lúmen intestinal, além de ser um potencial estímulo à secreção de cloro pelas células epiteliais, um evento que é compensado pela secreção subsequente de água na tentativa da recuperação do equilíbrio iônico. Adicionalmente, a liberação de proteases e outros mediadores das células inflamatórias provoca uma extensiva necrose na superfície mucosa, cerca de 24 a 48 horas após a infecção (Figura 5). Os debris necróticos resultantes, fornecem um substrato adequado para o crescimento bacteriano facilitando a disseminação e a contaminação ambiental (SANTOS et al., 2003; ZHANG et al., 2003; HALLSTROM; McCORMICK, 2011).

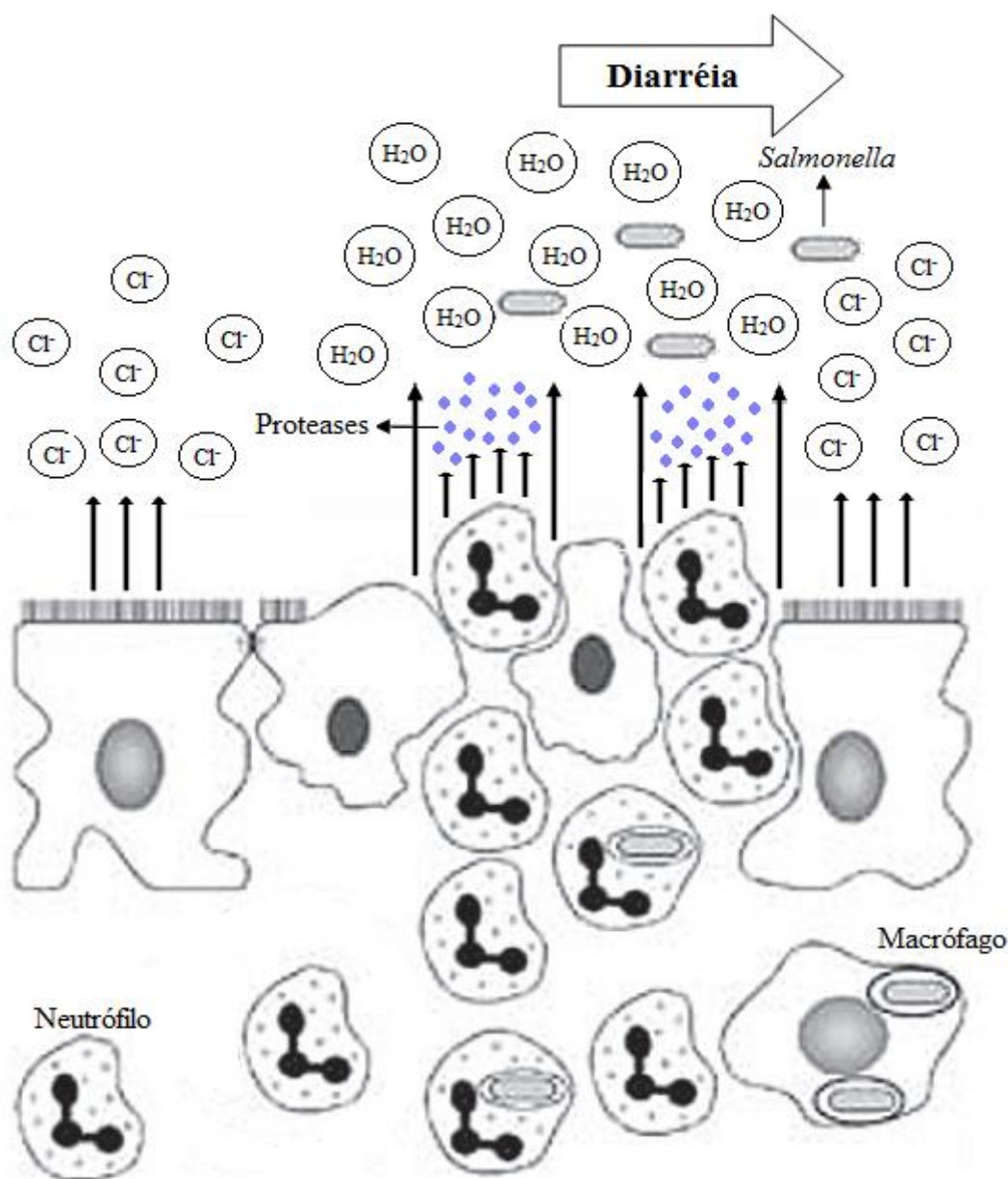


Figura 5 – Representação esquemática da secreção de fluídos dentro do lúmen intestinal como consequência da reação inflamatória decorrente da infecção por *Salmonella* spp.

Fonte: Adaptada de SANTOS et al., 2009.

No caso das salmonelas tifóides, a atuação de mecanismos exclusivos de virulência permite a evasão da resposta imune do hospedeiro, facilitando a disseminação para outros órgãos, como linfonodos, fígado e baço, e o estabelecimento de uma infecção sistêmica (Figura 6). A virulência dessas salmonelas se deve, principalmente, a um *locus* genético (*locus* *viaB*), codificado pela Ilha de Patogenicidade 7 da *Salmonella* (SPI-7), o qual atenua a produção de citocinas e o recrutamento de neutrófilos, além de conter genes envolvidos na regulação, biossíntese e exportação do antígeno de virulência Vi. Este antígeno, por sua vez, inibe o reconhecimento do LPS por receptores Toll-like do tipo 4 (TLR-4), expressados em macrófagos e monócitos, durante a bacteremia, impedindo a produção das citocinas por estas células. Após invadir a região da lâmina própria, estas bactérias podem ainda reprimir a expressão do flagelo, evitando o reconhecimento por receptores Toll-like do tipo 5 (TLR-5), atenuando a resposta inflamatória. Além desses fatores, a toxina tifóide, liberada da bactéria intracelular, causa danos ao DNA, uma ação destinada preferencialmente para destruir células de rápida divisão celular, tais como populações de células B e T (RAFFATELLU et al., 2008; SETH-SMITH, 2008; ANDREWS-POLYMENIS et al., 2010; JANSEN et al., 2011).

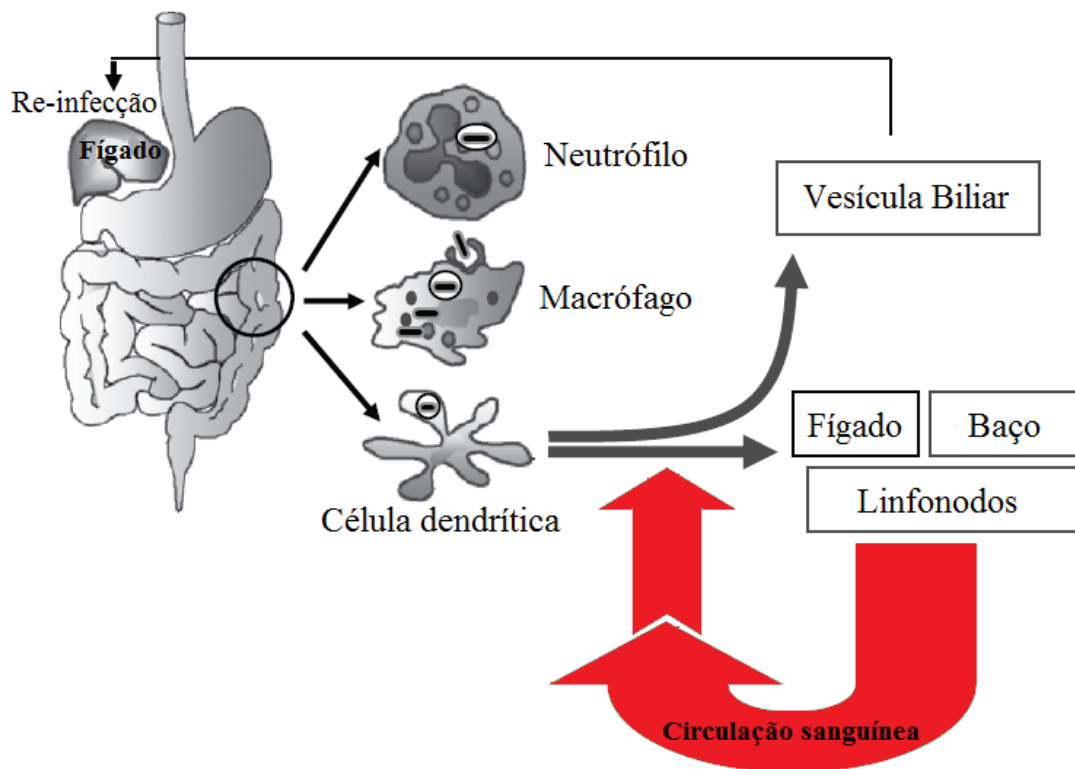


Figura 6 – Representação esquemática da disseminação sistêmica das salmonelas tifóides.
Fonte: Adaptada de BHUNIA, 2008.

A infecção sistêmica causada pela salmonelas tifóides está associada ao desenvolvimento gradual de infiltrados inflamatórios mononucleares no intestino, e aumenta a probabilidade de colonização da vesícula biliar, da qual a bactéria pode ser reintroduzida intermitentemente dentro do intestino (ANDREWS-POLYMENIS et al., 2010; figura 6).

2.7 Patogênese das infecções por *Salmonella* spp. em aves

A patogênese das infecções por *Salmonella* spp. em aves é influenciada por diversos fatores como a idade da ave, a dose infectante, a rota de infecção, a invasividade do sorotipo ou da estirpe e, no caso de galinhas, até mesmo a raça (POPPE, 2000).

De maneira geral, a infecção por *Salmonella* spp. é localizada, principalmente, no trato gastrointestinal e o microrganismo é frequentemente excretado nas fezes. A entrada no organismo hospedeiro geralmente se dá por via oral; porém em pintinhos recém-nascidos, ocorre preferencialmente por via nasal e cloacal (POPPE, 2000; KABIR, 2010).

Após a inoculação oral, o primeiro sítio de infecção é o ingluvío (papo), um ambiente contendo uma mistura de alimento com água e saliva, propício ao crescimento da bactéria. A partir daí, a bactéria segue em direção ao ceco, colonizando os enterócitos mediante a ação das proteínas efetoras do T3SS da SPI-1, com consequente ativação das citocinas pró-inflamatórias (RICKE, 2003; CRHANOVA et al., 2011). Ao cruzar as placas de Peyer, o patógeno é engolfado por macrófagos e, mediado pelo T3SS da SPI-2, dissemina-se através da corrente sanguínea e/ou do sistema linfático até outros órgãos, tais como fígado e baço, os quais são os seus principais sítios de replicação (BARROW; HUGGINS; LOVELL, 1994; DIEYE et al., 2009). Em casos de resposta imunológica inadequada, a bactéria pode migrar para outros órgãos como, ovário, oviduto, miocárdio, pericárdio, moela, saco vitalino e pulmões (KABIR, 2010).

2.8 Características clínicas das infecções por *Salmonella* spp. em humanos

Em humanos, as salmoneloses podem ser divididas em quatro perfis clínicos distintos: gastroenterite, bacteremia, febre entérica e estado de portador crônico.

2.8.1 Gastroenterite

As infecções por *Salmonella* não-tifóide comumente se manifestam na forma de uma gastroenterite, cerca de 6 a 48 horas após a ingestão da bactéria; entretanto, esse período está diretamente relacionado à dose infectante ingerida, ou seja, quanto maior a dose infectante, menor o período de incubação e vice-versa (ABE et al., 2004; MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006).

A maioria dos pacientes apresenta sintomas tais como, diarreia (sanguinolenta ou não), náusea, vômito, desidratação, dor abdominal, dor de cabeça, febre, calafrios, mialgia, fraqueza muscular e mal-estar geral. Em indivíduos saudáveis, os sintomas são, usualmente, auto-limitados, com uma duração média de 3 a 4 dias (HUANG et al., 2004; BUHNIA, 2008).

2.8.2 Bacteremia

A bacteremia é uma forma invasiva e severa da doença que pode ocorrer em determinados grupos como, crianças, idosos, pacientes em uso de imunossupressor e portadores de co-morbidades (ex.: câncer, diabetes) e de disfunções imunológicas (ex.: HIV/AIDS, lupus eritematoso sistêmico – LES) (HABIB, 2004). A bacteremia pode se manifestar sozinha ou associada à gastroenterite, bem como apresentar focos extra-intestinais da infecção em locais como pulmões, tecidos moles, ossos e articulações, meninges, artérias, trato urinário e peritônio. O óbito, nesse caso, é mais prevalente em pacientes com estado de imunossupressão severa (KARIUK et al., 2006; DHANOA; FATT, 2009).

2.8.3 Febre entérica

A febre entérica pode ser causada por *Salmonella* sorotipos Typhi e Paratyphi A, B e C, sendo conhecida como febre tifóide e febre paratifóide, respectivamente. Esta última, tem um período de incubação menor e costuma ser mais branda. De forma geral, a febre entérica tem um período de incubação variável, de 6 a 30 dias, e é caracterizada pelo seu início insidioso, seguido por um aumento gradativo da febre, que pode atingir a faixa de temperatura de 38°C a 40°C por volta do terceiro ou quarto dia. Sinais e sintomas como

forte dor de cabeça, mal-estar, anorexia, relativa bradicardia, hepatoesplenomegalia, manchas rosas na região do tronco, tosse seca e, em alguns casos, constipação, completam o quadro clínico da doença. A febre é, geralmente, menor pela manhã, atingindo o pico entre o final da tarde e o início da noite (BHATTARAI; MINTZ, 2011; CDC, 2001).

A diarreia pode ocorrer em cerca de um terço dos pacientes, após o início da febre, e o estabelecimento de uma infecção sistêmica é independente do estado imunológico do hospedeiro (RAFFATELLU et al., 2008). Complicações podem ocorrer, geralmente, depois de duas a três semanas, incluindo hemorragia e/ou perfuração intestinal e, raramente, pode ocorrer comprometimento do pâncreas e da vesícula biliar (MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006; BHATTARAI; MINTZ, 2011).

2.8.4 Estado de portador crônico

O estado de portador crônico é caracterizado pela presença de *Salmonella* spp. em amostras de fezes e urina por um período superior a um ano (MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006). A bactéria coloniza a vesícula biliar e, mesmo após o cessamento dos sintomas, permanece neste local, atuando como um reservatório para a propagação da doença. Esse estado está frequentemente associado com a presença de pedras na vesícula, sobre as quais a bactéria forma um biofilme, facilitando a colonização (CRAWFORD et al., 2010; GONZALEZ-ESCOBEDO; MARSHALL; GUNN, 2011).

2.9 Características clínicas das infecções por *Salmonella* spp. em aves

A salmonelose em aves, geralmente é caracterizada por retardo no crescimento, cegueira, anorexia, diarreia aquosa, desidratação, fraqueza, adipsia e aumento de mortalidade. Em aves adultas, ainda pode ocorrer diminuição na produção de ovos, redução da fertilidade e da eclodibilidade dos ovos. Aves que são infectadas ainda jovens e sobrevivem com poucas manifestações clínicas podem se tornar portadoras, da mesma forma que aves que são infectadas já adultas e não exibem nenhum sinal ou sintoma da doença, atuam como portadoras assintomáticas, alojando a bactéria nos órgãos reprodutivos (POPPE, 2000; KABIR, 2010).

2.10 Epidemiologia

As salmonelas estão entre os principais patógenos causadores de doença de origem alimentar distribuídos mundialmente, levando à milhões de casos anuais de diarreia tanto em países em desenvolvimento quanto em países industrializados (HENDRIKSEN et al., 2009).

Cerca de um século atrás, houve um significativo declínio nas taxas de infecção pelos sorotipos tifóides nos países industrializados, paralelo à adoção de medidas de melhoramento sanitário e de higiene, bem como do acompanhamento de portadores (HARDY, 2004; CRUMP; MINTZ, 2010). À medida que as infecções por salmonelas tifóides declinavam, aumentavam os registros de infecções pelos sorotipos não-tifóides, podendo ser observada uma tendência análoga entre a distribuição de sorotipos em infecções humanas e a distribuição de sorotipos em animais e alimentos (MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006).

Ao mesmo tempo que se estabelecia o processo de industrialização e de globalização na cadeia produtiva de aves domésticas e ovos, era observado o surgimento de *Salmonella* spp. neste âmbito produtivo, principalmente de *Salmonella* sorotipo Enteritidis, hipotetizada como a possível desencadeadora das epidemias de salmonelose não-tifóide em humanos. No atual sistema de produção em massa, a disseminação de *Salmonella* spp. pode ser amplificada pelo comércio internacional de animais vivos colonizados, para abastecimento da produção animal com animais reprodutores para melhoramento genético, bem como pelo comércio de alimentos em uma escala global (MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006; MAJOWICZ et al., 2010).

Atualmente, estima-se que ocorram, por ano, cerca de 21,5 milhões de casos de febre tifóide e 215.000 óbitos relacionados, no mundo. Adicionalmente, a estimativa de morbidade por febre paratifóide é de cerca de 5,5 milhões de casos anuais. O risco para aquisição das febres tifóide e paratifóide está estreitamente relacionado à faixa etária – acometendo principalmente crianças e adolescentes – e também à região geográfica. Regiões de alta incidência de febre tifóide (>100/100.000 casos/ano) incluem o centro-sul e o sudeste da Ásia; regiões de média incidência (10-100/100.000 casos/ano) incluem o resto da Ásia, África, América Latina e Caribe, e Oceania (exceto Austrália e Nova Zelândia); e as regiões de baixa incidência (<10/100.000 casos/ano) incluem Europa, América do Norte e os demais países desenvolvidos. Quanto à febre paratifóide, as regiões

sul e sudeste da Ásia são as de maior risco para a aquisição da doença (CRUMP; LUBY; MINTZ, 2004; BHATTARAI; MINTZ, 2011).

As infecções por *Salmonella* não-tifóide em humanos representam uma carga considerável tanto nos países em desenvolvimento quanto nos países desenvolvidos, com uma estimativa de 93,8 milhões de casos anuais de salmonelose não-tifóide, dos quais, aproximadamente, 80,3 milhões são de origem alimentar, ocorrendo cerca de 155.000 óbitos (MAJOWICZ et al., 2010).

Sob uma perspectiva global, *Salmonella* sorotipos Enteritidis e Typhimurium são, respectivamente, os sorotipos isolados com maior frequência, com exceção da América do Norte e da Oceania, em que *Salmonella* sorotipo Typhimurium é o principal sorotipo isolado seguido de *Salmonella* sorotipo Enteritidis. Além destes dois sorotipos, há tantos outros frequentemente isolados em uma dimensão global, sendo eles, respectivamente: *Salmonella* sorotipos Newport (isolado principalmente nas Américas do Norte e Latina e na Europa), Infantis (distribuído mundialmente), Virchow (registrado principalmente na Ásia, Europa e Oceania), Hadar (frequente na Europa) e Agona (frequente nas Américas do Norte e Latina e na Europa) (HENDRIKSEN et al., 2011).

Em um estudo, realizado na Coreia, entre 1998 e 2007, Kim (2010) identificou *Salmonella enterica* como um dos principais patógenos de origem alimentar disseminados pelo país. Durante esse período, foi evidenciada a prevalência de *Salmonella* sorotipos Typhi, Enteritidis e Typhimurium. Contudo, houve um notável declínio nas taxas de infecções causadas por esses sorotipos, ao tempo que emergiam casos de infecção por *Salmonella* sorotipo Infantis, e casos importados e surtos decorrentes de sorotipos raros (*Salmonella* sorotipos Othmarschen, London, Paratyphi A, Weltevreden e Anatum), os quais têm sido classificados entre os sorotipos mais disseminados na Coreia após 1998.

Entre o período de 1999 e 2008, em Cambridge, Reino Unido, Matheson et al. (2010) realizaram um estudo de revisão de todas as infecções por *Salmonella* spp. diagnosticadas nesse período. Constataram o registro de 1.003 casos de gastroenterite causados por 88 diferentes sorotipos da bactéria, sendo que desses os mais prevalentes foram os sorotipos Enteritidis (59%), Typhimurium (4,7%), Virchow (2,6%), Newport (1,8%) e Braenderup (1,7%).

No Sul da Austrália, no período de fevereiro a julho de 2008, foi conduzido um estudo descritivo de série de casos de infecções humanas por *Salmonella* spp., no qual foram identificados 31 diferentes sorotipos, com predomínio de *Salmonella* sorotipo

Typhimurium (61,7%). A infecção foi associada ao consumo de carne de frango e ovos, sendo que, dentre esses, os isolados prevalentes foram *Salmonella* sorotipos Infantis e Typhimurium (FEARNLEY et al., 2011).

Nos Estados Unidos, as salmonelas não-tifóides são as principais bactérias causadoras de doença de origem alimentar e, entre todos os patógenos causadores dessas doenças (bactérias, parasitas e vírus), atuam como a principal causa de hospitalização e óbito, tendo como principais representantes *Salmonella* sorotipos Enteritidis, Typhimurium, Newport e Javiana, respectivamente. Anualmente, são registrados cerca de 1 milhão de infecções de origem alimentar, mais de 19.000 casos de hospitalização e, aproximadamente, 380 óbitos associados a *Salmonella* não-tifóide (CDC², 2011; SCALLAN et al., 2011).

Conforme dados do Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 e 2011, no Brasil, as bactérias do gênero *Salmonella* spp. foram as principais causadoras de doenças transmitidas por alimentos, levando à ocorrência de mais de 1.600 surtos ao longo desse período. Os anos em que foram registrados os maiores índices de surto por essa bactéria foram, respectivamente, 2002, 2008 e 2001. Por outro lado, 2011 e 2010, respectivamente, apresentaram os menores índices de surto. As residências foram os principais locais relacionados a esses surtos e a ingestão de alimentos mistos e ovos e produtos a base de ovos foram consideradas as principais classes de alimentos envolvidos (BRASIL, 2011).

Entre 2001 e 2007, os cinco sorotipos mais isolados de infecções humanas, no país, foram *Salmonella* sorotipos Enteritidis, Typhimurium, Typhi, Agona e Paratyphi B (HENDRIKSEN, 2011). Entre 2008 e 2010, *Salmonella* sorotipos Enteritidis e Typhimurium mantiveram a mesma posição dos anos anteriores; contudo, *Salmonella* sorotipo Typhi declinou, passando a ocupar a sexta posição entre os principais sorotipos de infecções humanas (WHO, 2011).

No estado de Mato Grosso do Sul, entre os anos de 1998 e 2001, foi feito um levantamento epidemiológico dos surtos de toxinfecção alimentar. A salmonela foi a segunda bactéria mais isolada, presente em 14 surtos, representando 35,9% do total de surtos. *Salmonella* sorotipo Enteritidis foi o sorotipo mais isolado (81,4%) e a infecção foi relacionada, principalmente, ao consumo de pratos prontos e produtos de confeitaria (CÂMARA, 2002).

Mais adiante, entre agosto de 2005 e dezembro de 2006, foi realizada uma pesquisa de ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários de frangos de corte e em produtos de

abatedouro, na região central do estado. Aproximadamente 11%, de um total de 257 amostras coletadas, foram positivos para *Salmonella* spp., dos quais foram identificados sete diferentes sorotipos: *Salmonella* sorotipos Schwarzengrund (37,93%), Typhimurium (17,24%), Corvallis (13,8%), Enteritidis (10,34%), O:4,5:-:1,2 (10,34%), Senftenberg (6,9%) e Livingstone (3,44%) (BONI; CARRIJO; FASCINA, 2011).

2.11 Resistência antibiótica

A resistência antibiótica entre bactérias do gênero *Salmonella* spp. surge como resultado da pressão seletiva do uso, muitas vezes indiscriminado, de antibióticos no homem e em animais destinados à alimentação (WHO, 2005). Porém, outros fatores devem ser levados em consideração, como, por exemplo, a tendência de determinados sorotipos a desenvolver resistência. *Salmonella* sorotipo Typhimurium é um dos sorotipos que apresenta essa propensão. Por outro lado, *Salmonella* sorotipo Enteritidis apresenta baixos índices de resistência, devido à sua dificuldade de adquirir elementos genéticos móveis (ex.: plasmídeos) que codificam genes para resistência em outros sorotipos (MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006).

O aumento progressivo na prevalência e no número de classes de antibióticos envolvidos é observado desde o início de 1960, quando foram feitos os primeiros relatos de isolados de *Salmonella* spp. com perfil de resistência antibiótica (HELMUTH, 2000; MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006). Tendo em vista o aumento da resistência aos antibióticos convencionais, tais como ampicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim, foi necessário eleger novas opções terapêuticas para o tratamento de salmoneloses invasivas. Cefalosporinas de amplo-espectro e quinolonas e seus derivados se tornaram as drogas de escolha para o tratamento dessas infecções. Entretanto, já na década de 90, foram relatados os primeiros surtos e casos de infecção causados por isolados resistentes a essas drogas (SU et al., 2004).

Desde então, o avanço da resistência contra esses agentes antibióticos ocorre como resultado da disseminação de material genético contendo os devidos genes codificadores. No caso das quinolonas, isso ocorre através de mutações no genoma bacteriano. Quanto aos demais antibióticos, ocorre pela transferência de material genético – geralmente o plasmídeo – entre as bactérias (WHO, 2005; FOLEY; LYNNE, 2008).

Atualmente, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de esclarecer os fatores associados à disseminação e à transmissão do fenótipo de resistência às diversas classes de antibióticos envolvidas.

O estudo realizado por Koningstein et al. (2010), mostrou a associação entre o uso prévio de antibióticos, particularmente fluoroquinolonas, e o aumento na incidência de infecções humanas de origem alimentar por isolados de *Salmonella* spp. resistentes a essas drogas. Além disso, o período de uso do antibiótico mais próximo à data da infecção foi considerado um importante fator de risco.

Contudo, a maioria das pesquisas aponta o uso de antibióticos na produção animal como o principal fator contribuinte para o surgimento e a disseminação de salmonelas resistentes. Na pecuária, essas drogas são utilizadas para fins profiláticos, terapêuticos e de promoção de crescimento. Adicionalmente, os resíduos de antibióticos são liberados no ambiente. Dessa forma, é exercida uma pressão seletiva sobre as bactérias, selecionando as que são resistentes (HELMUTH, 2000).

Na Grã-Bretanha, Anjum et al. (2011), avaliaram 225 isolados de *Salmonella* spp. oriundas da pecuária e, desses, cerca de 43% apresentaram resistência a um ou mais agentes antibióticos (aminoglicosídeos, quinolonas, sulfonamidas, tetraciclinas, β -lactâmicos, trimetoprim, cloranfenicol), apesar de ser detectada pouca e nenhuma resistência à ciprofloxacina e às cefalosporinas de terceira geração, respectivamente.

Lu et al. (2011), avaliaram o perfil de resistência antibiótica de *Salmonella* sorotipos Enteritidis e Indiana, isolados de frangos, na China. Entre os isolados de *Salmonella* sorotipo Indiana, mais de 80% foram altamente resistentes a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefalotina, ceftiofur, cloranfenicol, florfenicol, tetraciclina, doxiciclina, kanamicina e gentamicina; além de cerca de 60% dos isolados resistentes a enrofloxacina, norfloxacina e ciprofloxacina. Já os isolados de *Salmonella* sorotipo Enteritidis, apresentaram resistência a ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, tetraciclina e doxiciclina.

No estudo de Singh et al. (2011), na Índia, foi evidenciado um perfil de multi-resistência compartilhado entre amostras de *Salmonella* não-tifóide isoladas de humanos, animais e alimentos. A resistência foi observada contra eritromicina, metronidazol, clindamicina, ampicilina, cotrimoxazol, colistina, ácido nalidíxico, amoxiclave, cefalexina, meropenem, tobramicina, nitrofurantoína, tetraciclina, amoxicilina, esparfloxacina e estreptomicina.

No Brasil, um estudo realizado na região sul do país, identificou *Salmonella* sorotipo Enteritidis, isoladas de aves, alimentos e humanos, com um mesmo perfil genotípico e com características de resistência antibiótica semelhantes. Mais da metade dos isolados apresentou resistência a sulfonamida, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina (VAZ et al., 2010).

Todos esses estudos mostram a resistência dos isolados, tanto humanos quanto de animais e alimentos, contra drogas produzidas para o uso terapêutico humano, evidenciando a aplicação inadequada das mesmas na prevenção e controle de salmoneloses. Como consequência, a eficácia do tratamento das infecções humanas é significativamente diminuída, com limitação das opções terapêuticas e tratamento tardio. Além disso, sob uma perspectiva global, aumenta-se o risco de surtos e, por conseguinte, a morbidade e a mortalidade humanas (MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006).

2.12 Diagnóstico laboratorial

2.12.1 Bacteriologia

O isolamento de *Salmonella* spp. deve, preferencialmente, passar por três etapas: pré-enriquecimento não-seletivo, enriquecimento seletivo e plaqueamento em meio de cultura seletivo. Esse procedimento se aplica tanto a amostras de alimentos, quanto a amostras clínicas de humanos e animais (MØLBAK; OLSEN; WEGENER, 2006).

O pré-enriquecimento não-seletivo é de suma importância no caso de amostras que contenham um baixo número de *Salmonella* spp., bem como quando a célula bacteriana passou por algum processo de *stress* ambiental. O uso de caldos não-seletivos, como água peptonada tamponada ou caldo Lactose, permite a recuperação dessas bactérias, habilitando-as a sobreviver nos meios seletivos. O enriquecimento seletivo pode ser feito em caldo Tetrionato, caldo Rappaport-Vassiliadis ou caldo Selenito Cistina, os quais possuem certas substâncias inibitórias para outras bactérias, e permitem a multiplicação das salmonelas. Já os meios de plaqueamento seletivo contém substâncias que, além de inibir certas bactérias, conferem características coloniais diferenciadas às salmonelas. Como exemplos desses meios, podem ser citados os ágars Hektoen Entérico (HE), *Salmonella-Shigella* (SS), Verde Brilhante (AVB), Xilose-Lisina Deoxicolato (XLD), Bismuto Sulfito (ABS) e Rambach (WALTMAN, 2000; WHO, 2010).

Subsequentemente, colônias características de *Salmonella* spp. devem ser isoladas e testadas bioquimicamente. Existe uma ampla variedade de meios bioquímicos disponíveis para esse fim; contudo, é recomendado utilizar um número limitado destes, que seja suficiente para a realização de um teste de triagem que exclua bactérias como *Citrobacter* e *Proteus*. Dentre esses meios podem ser citados ágar tríplice açúcar ferro (TSI), lisina descarboxilase, ornitina descarboxilase, ágar uréia e teste de indol (HENDRIKSEN, 2003; JENKINS; GILLESPIE, 2006).

2.12.2 Sorologia por aglutinação em látex

Os testes de triagem sorológica também podem ser realizados logo após o isolamento das colônias. Aquelas que apresentarem características de *Salmonella* spp. são, portanto, submetidas ao teste de aglutinação em látex para a confirmação do gênero. Esse teste é disponibilizado, geralmente, na forma de kit contendo anticorpos polivalentes contra os antígenos O, H e Vi. Os anticorpos, por sua vez, se encontram acoplados a partículas de látex, de forma a melhorar a sensibilidade e a visualização da aglutinação (ZEE; VELD, 2000).

O antígeno e o soro são misturados na superfície de uma lâmina ou placa de aglutinação, formando uma suspensão homogênea, que deve ser mantida em constante movimento durante um espaço de tempo determinado pelo fabricante. Reações de aglutinação que ocorrerem dentro desse dado período são, portanto, consideradas positivas (WINN; KONEMAN, 2010).

2.12.3 Sorotipagem

A sorotipagem é um método de referência para a diferenciação de sorotipos das duas espécies de *Salmonella* spp., o qual está baseado na imuno-reatividade dos antígenos O, H e Vi (se presente). Esses antígenos são detectados em testes de aglutinação independentes, onde suspensões de *Salmonella* spp. são misturadas e incubadas com um painel de anti-soros específicos. Após a determinação isolada dos perfis de aglutinação, a combinação antigênica é feita conforme o esquema de Kauffmann-White, designando, assim, o respectivo sorotipo (ELLERMEIER; SLAUCH, 2006; CDC, 2008). Porém, a designação do sorotipo por esta técnica pode não ser possível em casos de auto-aglutinação

ou perda de expressão do antígeno, como observado em isolados rugosos, imóveis e mucóides (WATTIAU; BOLAND; BERTRAND, 2011).

Por ser um método baseado exclusivamente em características fenotípicas, a sorotipagem não provê uma caracterização genética sensível nem define relações filéticas. Portanto, para a identificação de isolados relacionados epidemiologicamente, este método deve ser seguido por uma tipagem molecular (WATTIAU; BOLAND; BERTRAND, 2011).

2.13 Tipagem molecular por Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A tipagem molecular é uma importante ferramenta para a identificação da origem de salmonelas em infecções humanas, permitindo a correlação epidemiológica entre os isolados e, conseqüentemente, a adoção de medidas de prevenção e controle que diminuam a incidência da doença e a ocorrência de surtos. Dentre os diversos métodos disponíveis, a PFGE (do inglês, Pulsed-Field Gel Electrophoresis) se destacou, sendo considerada padrão-ouro, não só para a tipagem de *Salmonella* spp., mas também de outros micro-organismos (FOLEY et al., 2006; FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007).

Essa técnica foi introduzida em 1984 por David C. Schwartz e Charles R. Cantor, que fragmentaram DNA cromossomal de *Saccharomyces cerevisiae* pela aplicação de dois campos elétricos alternados em gel de agarose (SCHWARTZ; CANTOR, 1984). A partir de então, a técnica foi aprimorada e adaptada para outros micro-organismos. A adaptação para bactérias do gênero *Salmonella* spp. ocorreu na década de 90 (OLSEN et al., 1994; WEIDE-BOTJES et al., 1998).

Uma variedade de configurações eletroforéticas, utilizando correntes pulsadas em diferentes direções, também foi desenvolvida, como Eletroforese em Gel de Campo Alternado Ortogonalmente (Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis – OFAGE) (CARLE; OLSON, 1984), Eletroforese Vertical em Gel de Campo Alternado (Vertical Alternating Field Gradient Gel Electrophoresis – VAFGE) (GARDINER; LAAS, PATTERSON, 1986), Eletroforese em Gel de Campo de Inversão Periódica (Periodic Field Inversion Gel Electrophoresis – PFIGE) (CARLE; FRANK; OLSON, 1986) e Eletroforese em Campo Elétrico Homogêneo de Contorno Estreito (Contour-Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis – CHEF – (CHU; VOLLRATH; DAVIS, 1986).

Dentre essas alternativas, a CHEF é o método de PFGE mais utilizado, contendo três componentes principais: i) um módulo de potência para gerar as voltagens do eletrodo e para fornecer a mudança dos parâmetros, ii) um módulo de arrefecimento para manter a temperatura a 14 °C e, iii) uma câmara de eletroforese com 24 eletrodos horizontais arranjados em um hexágono, formando ângulos de re-orientação de 60-120° (WU; DELLA-LATTA, 2006).

O número e a configuração dos eletrodos influenciam significativamente a resolução da PFGE, pois eles alteram a forma do campo elétrico aplicado. Para que se obtenha uma alta resolução é necessário que os eletrodos estejam arranjados de maneira a gerar ângulos maiores que 110° (CANTOR; GAAL; SMITH, 1988).

A metodologia da PFGE possui quatro passos principais: i) lise celular e liberação do DNA cromossomal intacto, ii) digestão do DNA cromossomal por enzimas de restrição, iii) separação dos fragmentos de DNA e, iv) análise do padrão de fragmentos de DNA gerado (RIBOT et al., 2006).

Inicialmente, uma suspensão da cultura bacteriana pura deve ser misturada a agarose e adicionada em moldes para a formação de “plugs” de agarose, que previnem a quebra mecânica do DNA. Estes “plugs” são submersos em uma solução de enzimas e detergentes que lisam e desproteinizam as células, liberando a molécula de DNA. Em seguida, passam por subsequentes lavagens para a remoção dos debris celulares e da solução de lise. Após o término do processo de lavagem os “plugs” são incubados com uma enzima de restrição de corte raro e, posteriormente, submetidos à eletroforese, considerando as condições adequadas para cada parâmetro (concentração e composição do gel de agarose e do tampão, voltagem, temperatura de corrida, tempo de pulso, força do campo elétrico, ângulo de pulso e tempo de corrida) (MAGALHÃES et al., 2005; RIBOT et al., 2006; WU; DELLA-LATTA, 2006).

Por fim, os fragmentos de DNA no gel de agarose são corados e interpretados de acordo com critérios pré-estabelecidos, classificando os isolados como indistinguíveis, proximamente relacionados, possivelmente relacionados ou não-relacionados (TENOVER et al., 1995; RIBOT et al., 2006).

Os isolados considerados indistinguíveis são aqueles que apresentam um padrão de bandas idêntico e, portanto, representam uma mesma cepa. Os isolados proximamente relacionados podem apresentar até três bandas de diferença, o que equivale a um único evento genético (mutação de ponto, inserção ou deleção de DNA). Esse tipo de relação

geralmente é observada em isolados cultivados repetidamente mais de uma vez ou isolados várias vezes de um mesmo paciente. Os isolados possivelmente relacionados diferem de quatro a seis bandas, equivalendo a dois eventos genéticos independentes. Esta diferença pode ser observada entre isolados coletados em longos períodos de tempo (≥ 6 meses) ou de um grande número de pacientes envolvidos em surtos extensos. Já aqueles isolados que apresentam sete ou mais bandas de diferença, equivalentes a três ou mais eventos genéticos independentes, são classificados como não-relacionados (TENOVER et al., 1995; BARRET; GERNER-SMIDT; SWAMINATHAN, 2006). Na tabela 2 é mostrado como os eventos genéticos alteram o padrão da PFGE.

Tabela 3 – Efeitos dos eventos genéticos nos padrões da PFGE

Tipo de evento genético	Alterações no padrão da PFGE
Mutação de ponto resultando na criação de um sítio de restrição	A mutação dividirá um único fragmento de restrição em dois fragmentos menores. A perda do fragmento original representa uma banda de diferença, e a aparição dos dois novos fragmentos representa duas bandas de diferença; portanto, esta é considerada uma diferença de três bandas.
Mutação de ponto resultando na perda de um sítio de restrição	A mutação formará um único fragmento grande a partir de dois fragmentos menores. A perda dos dois fragmentos originais representa duas bandas de diferença e a aparição de uma nova banda única representa uma banda de diferença; portanto, esta é considerada uma diferença de três bandas.
Inserção de DNA dentro de um sítio de restrição existente	O padrão alterado terá o mesmo número de fragmentos do padrão original, porém perderá um pequeno fragmento e apresentará um novo fragmento de tamanho maior. Esta é considerada uma diferença de duas bandas.
Deleção de DNA de um fragmento (material deletado não contém um sítio de restrição)	O padrão alterado terá um novo fragmento de tamanho menor e perderá um fragmento maior. Esta é considerada uma diferença de duas bandas.

Fonte: Adaptada de TENOVER et al., 1995

O uso de enzimas de restrição de corte raro e a aplicação de campos elétricos pulsados permite a separação do DNA cromossomal completo em fragmentos de até 2000 kb, gerando padrões específicos da estirpe (SCHWARTZ; CANTOR, 1984; FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007; IMEM; RIDHA; MAHJOURB, 2012). Pela eletroforese convencional isto não seria possível, visto que se limita à separação de fragmentos relativamente pequenos de DNA (<50 kb); portanto, para a fragmentação do DNA cromossomal completo seria necessária a digestão com enzimas de restrição de corte

frequente, resultando em centenas de bandas incapazes de ser interpretadas (WU; DELLALATTA, 2006).

Um maior poder discriminatório é alcançado com o uso combinado de mais de uma enzima de restrição, permitindo discernir relações genéticas acuradas até mesmo entre sorotipos de *Salmonella* spp. compreendendo complexos de estirpes altamente homogêneas (ZHENG et al, 2011; ZOU; KEELARA; THAKUR, 2012).

Essa técnica é ainda caracterizada pelo alto nível de reprodutibilidade intra e interlaboratorial. A criação de uma rede de subtipagem molecular para vigilância de doenças bacterianas de origem alimentar (PulseNet), em 1996, nos Estados Unidos, tem auxiliado na padronização de protocolos de PFGE entre laboratórios e no compartilhamento de informações de epidemiologia molecular em tempo real, permitindo a comparação de fragmentos de restrição de isolados de regiões geográficas distantes (SWAMINATHAN et al., 2001; SWAMINATHAN et al., 2006). Adicionalmente, a PFGE é considerada uma importante ferramenta em contextos epidemiológicos de longo tempo de duração, abrangendo anos ou décadas, ou a um nível de país ou continente (LACONCHA et al., 2000; KAY et al., 2007; PANG et al., 2007; HOELZER et al., 2011)

Entretanto, a técnica requer trabalho intensivo que pode durar cerca de 3 a 4 dias. Além disso, mutações de ponto ou mudanças genéticas menores podem não alterar o padrão de PFGE; nestes casos somente uma grande alteração genética ou mutações no sítio de restrição da enzima utilizada poderiam alterar o padrão de PFGE. Porém, o uso de múltiplas enzimas de restrição aumenta significativamente a capacidade de diferenciação de isolados com tais alterações genéticas (THONG et al., 2002; SINGER; SISCHO; CARPENTER, 2004; FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007).

Apesar das desvantagens apresentadas, a PFGE tem sido o método de escolha de muitos pesquisadores. Em 2007, Pang et al., observaram, através da técnica de PFGE, a correlação entre isolados de *Salmonella* sorotipo Enteritidis de frangos e alimentos na Alemanha e de humanos no Taiwan. Tendo em vista que as mesmas foram isoladas de diferentes fontes e de áreas geograficamente distantes, os pesquisadores se fiaram na hipótese de um clone de distribuição mundial.

Akinyemi et al. (2010), na Nigéria, utilizaram a PFGE para investigar a possível origem do aumento na incidência de *Salmonella* spp. associada a gastroenterite de comunidade. Como resultado, foram identificados três grupos (*clusters*) de perfil de PFGE,

correlacionados entre amostras de humanos, água, esgoto e gado, indicando os três últimos como as possíveis fontes das infecções humanas.

Em um estudo realizado no Texas, a PFGE foi utilizada juntamente com questionários epidemiológicos para a detecção de surtos e veículos de transmissão. Os resultados apontaram viagem ou moradia no sul do Texas, consumo de ovos, contato com mini-tartarugas, produtos vegetais embalados e contato com hamsters como os possíveis fatores relacionados aos surtos humanos (LONG et al., 2010).

No Brasil, isolados de *Salmonella* sorotipo Enteritidis de humanos, alimentos e aves geraram perfis genotípicos de PFGE que possibilitaram diferenciar os isolados de pacientes com salmonelose dos isolados de origem não epidêmica. Além disso, esses resultados sugeriram os isolados de origem aviária como a provável origem das infecções humanas (KOTTWITZ et al., 2011).

A comparação com outros métodos confirma a relevância da PFGE na tipagem molecular. Técnicas baseadas em genes conservados, assim como na Tipagem por Sequência de Múltiplos Loci (Multilocus Sequence Typing – MLST) geram resultados com maior reprodutibilidade, considerando a facilidade de interpretação e comparação inter-laboratorial; entretanto, devido à sua estabilidade genética, apresentam um poder discriminatório menor que a PFGE, principalmente em estudos epidemiológicos a curto prazo (LIEBANA, 2002; FAKHR; NOLAN; LOGUE, 2005; TORPDAHL et al., 2005; FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007).

Outras técnicas, como Análise de Polimorfismo Numérico de Segmentos Repetitivos em Múltiplos Loci (Multilocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis – MLVA) e Análise de Polimorfismos de Comprimento de Fragmento Amplificado (Amplified Fragment Length Polymorphisms – AFLP), apesar de exibirem um alto poder discriminatório, requerem equipamentos especializados de alto custo de aquisição e manutenção, bem como programas de análise, também, de alto custo. Além disso, estas técnicas provêm níveis discriminatórios equivalentes aos apresentados pela PFGE (TORPDAHL et al., 2005; FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007).

Em contrapartida, técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), como Amplificação Randômica de DNA Polimórfico (Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD), Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP), Consenso de Repetição Intergênica de Enterobactérias (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – ERIC) e Palíndromo

Extragênico Repetitivo (Repetitive Extragenic Palindromic – REP), requerem apenas um termociclador e um equipamento de eletroforese em gel. Porém, tais técnicas apresentam um poder discriminatório limitado (FOLEY; ZHAO; WALKER, 2007). Dessa forma, a PFGE permanece como o método de escolha para a tipagem molecular de salmonelas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a circulação geográfica de salmonelas não-tifóides por meio de técnicas de rastreamento clássicas e moleculares.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar os sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de fontes humanas e não-humanas;
- Avaliar a distribuição geográfica dos sorotipos isolados;
- Determinar o perfil de susceptibilidade antibiótica dos isolados;
- Analisar a possível correlação entre os isolados considerando a origem e a região geográfica de isolamento, através da técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K. et al. Prolonged Incubation Period of Salmonellosis Associated with Low Bacterial Doses. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 12, p. 2735-2740, 2004.

ALTHOUSE, C. et al. Type 1 Fimbriae of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Bind to Enterocytes and Contribute to Colonization of Swine *In Vivo*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6446-6452, 2003.

AKINYEMI, K. O. et al. Application of Phage Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis to Analyse *Salmonella enterica* Isolates from a Suspected Outbreak in Lagos, Nigeria. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 4, n. 12, p. 828-834, 2010.

ANDREWS-POLYMERIS, H. L. et al. Taming the Elephant: *Salmonella* Biology, Pathogenesis, and Prevention. **Infection and Immunity**, v. 78, n. 6, p. 2356-2369, 2010.

ANJUM, M. F. et al. Identifying Antimicrobial Resistance Genes of Human Clinical Relevance Within *Salmonella* Isolated from Food Animals in Great Britain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 3, p. 550-559, 2011.

ARSENAULT, J. et al. Prevalence and Risk Factors for Salmonella and Campylobacter spp. Carcass Contamination in Broiler Chickens Slaughtered in Quebec, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 8, p. 1820-1828, 2007.

BARAK, J. D.; KRAMER, L. C.; HAO, L. Colonization of Tomato Plants by *Salmonella enterica* is Cultivar Dependent, and Type 1 Trichomes are Preferred Colonization Sites. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 2, p. 498-504, 2011.

BARMAN, M. et al. Enteric Salmonellosis Disrupts the Microbial Ecology of the Murine Gastrointestinal Tract. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 3, p. 907-915, 2008.

BARRET, T. J.; GERNER-SMIDT, P.; SWAMINATHAN, B. Interpretation of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Patterns in Foodborne Disease Investigations and Surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2006.

BARROW, P. A. *Salmonella* Control – Past, Present and Future. **Avian Pathology**, v. 22, n. 4, p. 651-669, 1993.

BARROW, P. A.; HUGGINS, M. B.; LOVELL, M. A. Host Specificity of *Salmonella* Infection in Chickens and Mice is Expressed *In Vivo* Primarily at the Level of the Reticuloendothelial System. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 10, p. 4602-4610, 1994.

BAYSTON, K. F.; COHEN, J. Bacterial Endotoxin and Current Concepts in the Diagnosis and Treatment of Endotoxaemia. **Journal of Medical Microbiology**, v. 31, p. 73-83, 1990.

BEARSON, B. L.; WILSON, L.; FOSTER, J. W. A Low pH-Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella typhimurium* against Inorganic Acid Stress. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 9, p. 2409-2417, 1998.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. Factors Affecting Growth and Survival of *Salmonella*. In: _____. (Orgs.). **Salmonella: A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods**. London: Blackwell Science, 2002. p. 84-98.

BENCHIMOL, J. L. Adolpho Lutz: Um Esboço Biográfico. **História, Saúde, Ciências – Manguinhos**, v. 10, n. 1, p. 13-83, 2003.

BHATTARAI, A.; MINTZ, E. Infectious Diseases Related to Travel. In: BRUNETTE, G. W. et al. (Eds.). **Yellow Book**. New York: Oxford University Press, 2011.

BHUNIA, A. K. *Salmonella enterica*. In: _____. (Org.). **Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis**. New York: Springer, 2008. p. 201-216.

BHUNIA, R. et al. A Typhoid Fever Outbreak in a Slum of South Dumdum Municipality, West Bengal, India, 2007: Evidence for Foodborne and Waterborne Transmission. **BMC Public Health**, v. 9, n. 115, p. 1-8, 2009.

BONI, H. F. K., CARRIJO, A. S.; FASCINA, V. B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em Aviários e Abatedouro de Frangos de Corte na Região Central do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 12, n. 1, p. 84-95, 2011.

BOURRET, T. J. et al. Nitric Oxide Antagonizes the Acid Tolerance Response that Protects *Salmonella* Against Innate Gastric Defenses. **PLoS ONE**, v. 3, n. 3, p. 1-11, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da DAS e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. Portaria n. 193, de 19 de setembro de 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Aprova as alterações Introduzidas no Método Analítico de Carcaças de Aves e Pesquisa de *Salmonella*. Portaria n. 8, de 23 de janeiro de 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Dados Epidemiológicos – DTA período de 2000 a 2011**. Brasília, DF, 2011.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

CAFFER, M. I.; TERRAGNO, R. **Manual de Procedimientos para la Caracterización de *Salmonella***. Buenos Aires: Ministerio de Salud, 2001. 37 p.

CÂMARA, S. A. V. Surtos de Toxinfecções Alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, no Período de 1998-001. 2002. 79 f. Monografia (Especialização em Gestão em Saúde) – Escola de Saúde Pública “Dr. Jorge David Nasser”, Mato Grosso do Sul. 2002.

CANTOR, C. R.; GAAL, A.; SMITH, C. L. High-Resolution Separation and Accurate Size Determination in Pulsed-Field Gel Electrophoresis of DNA. 3. Effect of Electrical Field Shape. **Biochemistry**, v. 27, n. 26, p. 9216-9221, 1988.

CARLE, G. F.; OLSON, M. V. Separation of Chromosomal DNA Molecules from Yeast by Orthogonal-Field-Alternation Gel Electrophoresis. **Nucleic Acids Research**, v. 12, n. 14, p. 5647-5664, 1984.

CARLE, G. F.; FRANK, M.; OLSON, M. V. Electrophoretic Separations of Large DNA Molecules by Periodic Inversion of the Electric Field. **Science**, v. 232, n. 4746, p. 65-68, 1986.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Communicable Disease Management Protocol: Typhoid and Paratyphoid Fever**. 2001. Disponível em: <http://www.gov.mb.ca/health/publichealth/cdc/protocol/typhoid.pdf>. Acesso em: 13 jan. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2006. 2008**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/SalmonellaAnnualSummary2006.pdf>. Acesso em: 22 maio 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Surveillance Overview, 2011¹**. Disponível em: http://www.cdc.gov/nationalsurveillance/PDFs/NationalSalmSurveillOverview_508.pdf. Acesso em: 16 jan. 2012.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection With Pathogens Transmitted Commonly Through Food – Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 60, n. 22, p. 749-755, 2011².

CHU, G.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W. Separation of Large DNA Molecules by Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields. **Science**, v. 234, n. 4783, p. 1582-1585, 1986.

CRAWFORD, R. W. et al. Gallstones Play a Significant Role in *Salmonella* spp. Gallbladder Colonization and Carriage. **PNAS**, v. 107, n. 9, p. 4353-4358, 2010.

CRHANOVA, M. et al. Immune Response of Chicken Gut to Natural Colonization by Gut Microflora and to *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Infection. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 7, p. 2755-2763, 2011.

CROSA, J. H. et al. Molecular Relationships Among the *Salmonelleae*. **Journal of Bacteriology**, v. 115, n. 1, p. 307-315, 1973.

CRUMP, J. A.; LUBY, S. P.; MINTZ, E. D. The Global Burden of Typhoid Fever. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 5, p. 346-353, 2004.

CRUMP, J. A.; MINTZ, E. D. Global Trend in Typhoid and Paratyphoid Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 2, p. 241-246, 2010.

CUNHA, B. A. The Death of Alexander the Great: Malaria or Typhoid Fever? **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, n. 1, p. 53-63, 2004.

D'AOUST, J.-Y.; MAURER, J. *Salmonella* Species. In: DOYLE, M. P.; BEUCHAT, L. R. (Eds.). **Food Microbiology**. Washington: ASM Press, 2007. p. 187-236.

DHANOVA, A.; FATT, Q. K. Non-Typhoidal *Salmonella* Bacteraemia: Epidemiology, Clinical Characteristics and its Association with Severe Immunosuppression. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 15, p. 1-7, 2009.

DIEYE, Y. et al. The *Salmonella* Pathogenicity Island (SPI) I Contributes more than SPI2 to Colonization of the Chicken by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **BMC Microbiology**, v. p, n. 3, p. 1-14, 2009.

DUERR, C. U. et al. O-Antigen Delays Lipopolysaccharide Recognition and Impairs Antibacterial Host Defense in Murine Intestinal Epithelial Cells. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 9, p. 1-13, 2009.

DUPONT, H. L. The Growing Threat of Foodborne Bacterial Enteropathogens of Animal Origin. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 10, p. 1353-1361, 2007.

EDITORIAL. Historical Notes: Typhoid Fever. **CMA Journal**, v. 119, p. 741, 1978.

ELLERMEIER, C. D.; SLAUCH, J. M. The Genus *Salmonella*. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**. New York: Springer, 2006. p. 123-158.

EZEAGWUANA, D. A. Investigating the Relationship between Malaria Parasitaemia and Widal Positivity. **The Internet Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 2, 2011.

FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K.; LOGUE, C. M. Multilocus Sequence Typing Lacks the Discriminatory Ability of Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2215-2219, 2005.

FALCÃO, D. P. et al. Unusual *Enterobacteriaceae*: Lactose-Positive *Salmonella typhimurium* Which is Endemic in São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 2, n. 4, p. 349-353, 1975.

FARMER III, J. J. et al. Unusual *Enterobacteriaceae*: A *Salmonella cubana* that is Urease Positive. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 106-107, 1975.

FEARNLEY, E. et al. *Salmonella* in Chicken Meat, Eggs and Humans; Adelaide, South Australia, 2008. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 219-227, 2011.

FERNANDES, S. A. et al. *Salmonella* Serovars Isolated From Humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FERNANDES, S. A. et al. CTX-M-2-Producing *Salmonella* Typhimurium Isolated from Pediatric Patients and Poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 4, p. 317-321, 2009.

FLINT, J. A. et al. Estimating the Burden of Acute Gastroenteritis, Foodborne Disease, and Pathogens Commonly Transmitted by Food: An International Review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 5, p. 698-704, 2005.

FOLEY, S. L. et al. Comparison of Subtyping Methods for Differentiating *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolates Obtained from Food Animal Sources. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 10, p. 3569-3577, 2006.

FOLEY, S. L.; ZHAO, S.; WALKER, R. D. Comparison of Molecular Typing Methods for the Differentiation of *Salmonella* Foodborne Pathogens. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 4, n. 3, p. 253-276, 2007.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. Food Animal-Associated *Salmonella* Challenges: Pathogenicity and Antimicrobial Resistance. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 14, p. 173-187, 2008.

GARDINER, K.; LAAS, W.; PATTERSON, D. Fractionation of Large Mammalian DNA Restriction Fragments Using Vertical Pulsed-Field Gradient Gel Electrophoresis. **Somatic Cell and Molecular Genetics**, v. 12, n. 2, p. 185-195, 1986.

GIANNELLA, R. A. *Salmonella*. In: BARON, S. (Org.). **Medical Microbiology**. Texas: Galveston, 1996.

GIANNELLA, R. A.; BROITMAN, S.A.; ZAMCHECK, N. Influence of Gastric Acidity on Bacterial and Parasitic Enteric Infections – A Perspective. **Annals of Internal Medicine**, v. 78, n. 2, p. 271-276, 1973.

GONZALEZ-ESCOBEDO, G.; MARSHALL, J. M.; GUNN, J. S. Chronic and Acute Infection of the Gall Bladder by *Salmonella* Typhi: Understanding the Carrier State. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 9-14, 2011.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F.; BOUVET, P. Taxonomy of the Genus *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 1-17.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.-X. **Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars**. Paris: WHO, 2007. 167 p.

GROISMAN, E. A. The Pleiotropic Two-Component Regulatory System PhoP-PhoQ. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 6, p. 1835-1842, 2001.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor Scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

HABIB, A. G. A Clinical Audit of Presentation and Outcome of *Salmonella* Septicaemia. **Annals Academy of Medicine Singapore**, v. 33, n. 6, p. 749-753, 2004.

HALLSTROM, K.; McCORMICK, B. A. *Salmonella* Interaction with and Passage Through the Intestinal Mucosa: Through the Lens of the Organism. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 88, p. 1-10, 2011.

HANNING, I. B.; NUTT, J. D.; RICKE, S. C. Salmonellosis Outbreak in the United States Due to Fresh Produce: Sources and Potential Intervention Measures. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 635-648, 2009.

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. *Salmonellae* Interplay With Host Cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 53-66, 2008.

HARDY, A. *Salmonella*: a Continuing Problem. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, p. 541-545, 2004.

HELMUTH, R. Antibiotic Resistance in *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 89-106.

HENDRIKSEN, R. **Laboratory Protocols – Level 1 Training Courses: Isolation of *Salmonella***. WHO, 2003. Disponível em: http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/salmonella1_pdf.pdf. Acesso em 30 mar. 2011.

HENDRIKSEN, R. et al. **The External Quality Assurance System of the WHO Global Salm-Surv, Year 2008**. Copenhagen: National Food Institute, 2009. 54 p.

HENDRIKSEN, R. et al. Global Monitoring of *Salmonella* Serovar Distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: Results of Quality Assured Laboratories from 2001 to 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 8, p. 887-900, 2011.

HOELZER, K. et al. *Salmonella* Cerro Isolated Over the Past Twenty Years from Various Sources in the US Represent a Single Predominant Pulsed-Field Gel Electrophoresis Type. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3-4, p. 389-393, 2011.

HOFER, E.; REIS, E. M. F. *Salmonella* Serovars in Food Poisoning Episodes Recorded in Brazil from 1982-1991. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 1, p. 7-9, 1994.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. Prevalência de Sorovares de *Salmonella* Isolados de Aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 55-62, 1997.

HOLST, O.; MORAN, A. P.; BRENNAN, P. J. Overview of the Glycosylated Components of the Bacterial Cell Envelope. In: MORAN, A. P. (Eds.). **Microbial Glycobiology**. Oxford: Elsevier, 2009. p. 3-13.

HÖLZER, S. U. et al. Effect of the O-Antigen Length of Lipopolysaccharide on the Functions of Type III Secretion Systems in *Salmonella enterica*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5458-5470, 2009.

HRIVNIAKOVÁ, L. et al. Salmonellosis Outbreak Due to *Salmonella* Enteritidis Phage Type 14b Resistant to Nalidixic Acid, Austria, September 2010. **Surveillance and Outbreak Reports**, v. 16, n. 34, p. 1-7, 2011.

HUANG, I.-F. et al. Nontyphoid Salmonellosis in Taiwan Children: Clinical Manifestations, Outcome and Antibiotic Resistance. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 38, n. 5, p. 518-523, 2004.

IMEM, B. S.; RIDHA, M.; MAHJOUR, A. Laboratory Typing Methods for Diagnostic of *Salmonella* Strains, the “Old” Organism That Continued Challenges. In: MAHMOUD, B. S. M. (Ed.). **Salmonella: A Dangerous Foodborne Pathogen**. Croatia: InTech, 2012. p. 349-372.

IVANOFF, B.; LEVINE, M. M.; LAMBERT, P. H. Vaccination Against Typhoid Fever: Present Status. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 72, n. 6, p. 957-971, 1994.

JANIS, C. et al. *In Vivo* Regulation of the Vi Antigen in *Salmonella* and Induction of Immune Responses with an *In Vivo*-Inducible Promoter. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 6, p. 2481-2488, 2011.

JANSEN, A. M. et al. A *Salmonella* Typhimurium-Typhi Genomic Chimera: A Model to Study Vi Polysaccharide Capsule Function *In Vivo*. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 7, p. 1-16, 2011.

JENKINS, C.; GILLESPIE, S. H. *Salmonella* spp. In: GILLESPIE, S. H.; HAWKEY, P. M. (Eds.). **Principles and Practice of Clinical Bacteriology**. Chichester: John Wiley Professio, 2006. p. 367-376.

JONES, B. D.; GHORI, N.; FALKOW, S. *Salmonella typhimurium* Initiates Murine Infection by Penetrating and Destroying the Specialized Epithelial M Cells of the Peyer's Patches. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 15-23, 1994.

KABIR, S. M. L. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 1, p. 89-114, 2010.

KAY, R. S. et al. Outbreak of Healthcare-Associated Infection and Colonization with Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Senftenberg in Florida. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, n. 7, 2007.

KARIUK, S. et al. Characterisation of Community Acquired Non-Typhoidal *Salmonella* from Bacteraemia and Diarrhoeal Infections in Children Admitted to Hospital in Nairobi, Kenya. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 101, p. 1-10, 2006.

KAUFFMANN, F. The Bacteriology of *Enterobacteriaceae*. 1966. In: BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* Nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

KAUFFMANN, F.; EDWARDS, P. R. Classification and Nomenclature of *Enterobacteriaceae*. **International Bulletin of Bacteriology Nomenclature and Taxonomy**, v. 2, n. 2, p. 2-8, 1952.

KIM, S. *Salmonella* Serovars from Foodborne and Waterborne Diseases in Korea, 1998-2007: Total Isolates Decreasing Versus Rare Serovars Emerging. **Journal of Korean Medical Science**, v. 25, n. 12, p. 1693-1699, 2010.

KÖHLER, H. et al. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Regulates Intercellular Junction Proteins and Facilitates Transepithelial Neutrophil and Bacterial Passage. **American Journal of Physiology – Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 293, n. 1, p. 178-187, 2007.

KONINGSTEIN, M. et al. The Interaction Between Prior Antimicrobial Drug Exposure and Resistance in Human *Salmonella* Infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1819-1825, 2010.

KOTTWITZ, L. B. et al. Molecular Characterization and Resistance Profile of *Salmonella* Enteritidis PT4 and PT9 Strains Isolated in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 7, p. 1026-1031, 2011.

KUMAR, R.; SURENDRAN, P. K.; THAMPURAN, N. Detection and Characterization of Virulence Factors in Lactose Positive and Lactose Negative *Salmonella* Serovars Isolated from Seafood. **Food Control**, v. 20, p. 376-380, 2009.

LACONCHA, I. et al. Genotypic Characterisation by PFGE of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Phage Types 1, 4, 6, and 8 Isolated from Animal and Human Sources in Three European Countries. **Veterinary Microbiology**, v. 75, p. 155-165, 2000.

LEIVE, L. The Cell Envelope; Spores. In: DAVIS, B. D. et al. (Eds.). **Microbiology**. Hagerstown: Harper & Row, 1973. p. 105-146.

LE MINOR, L.; POPOFF, M. Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the Type and Only Species of the Genus *Salmonella*. **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 37, n. 4, p. 465-468, 1987.

LIEBANA, E. Molecular Tools for Epidemiological Investigations of *S. enterica* subspecies *enterica* Infections. **Research in Veterinary Science**, v. 72, p. 169-175, 2002.

LONG, S. G. et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis for *Salmonella* Infection Surveillance, Texas, USA, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 983-985, 2010.

LOSOSKY, G. A. et al. Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Serum Vi Antibodies for Detection of Chronic *Salmonella typhi* Carriers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 12, p. 2266-2269, 1987.

LOTFY, N. M. et al. Detection of *Salmonella* spp. in Aquatic Insects, Fish and Water by MPN-PCR. **World Journal of Fish and Marine Sciences**, v. 3, n. 1, p. 58-66, 2011.

LU, Y. et al. Prevalence of Antimicrobial Resistance Among *Salmonella* Isolates from Chicken in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 1, p. 45-53, 2011.

MAGALHÃES, V. D. et al. Eletroforese em Campo Pulsante em Bacteriologia – Uma Revisão Técnica. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAJOWICZ, S. E. et al. The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MALIK-KALE P. et al. *Salmonella* – At Home in the Host Cell. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 125, p. 1-9, 2011.

MANSFIELD, L. P.; FORSYTHE, S. J. Demonstration of the Rb₁ Lipopolisaccharide Core Structure in *Salmonella* Strains with the Monoclonal Antibody M105. **Journal of Medical Microbiology**, v. 50, p. 339-344, 2001.

MATHESON, N. et al. Ten Years Experience of *Salmonella* Infections in Cambridge, UK. **Journal of Infection**, v. 60, n. 1, p. 21-25, 2010.

MEDEIROS, M. A. N. et al. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* in Chicken Carcasses at Retail in 15 Brazilian Cities. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-560, 2011.

MIGEEMANATHAN, S. et al. Effects of Temperature Abuse on Survival, Growth, and Inactivation of *Salmonella typhimurium* in Goat Milk. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2011.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. Microbial Stress Responses. In: _____. (Orgs.). **Microbial Physiology**. New York: Wiley-Liss, 2002. p. 582-611.

MOHANTY, S. et al. Neonatal Sepsis Due to *Salmonella* Typhi and Paratyphi A. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 3, n. 8, p. 633-638, 2009.

MØLBAK, K.; OLSEN, J. E.; WEGENER, H. C. *Salmonella* Infections. In: RIEMANN, H. P.; CLIVER, D. O. (Eds.). **Foodborne Infections and Intoxications**. California: Elsevier, 2006. p. 57-114.

MORITA, M. et al. Characterization of Lysine Decarboxylase-Negative Strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis Disseminated in Japan. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 46, p. 381-385, 2006.

NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

NOVOTNY, L. et al. Fish: A Potential Source of Bacterial Pathogens for Humans Beings. **Veterinary Medicine**, v. 49, n. 9, p. 343-358, 2004.

OHL, M. E.; MILLER, S. I. *Salmonella*: A Model for Bacterial Pathogenesis. **Annual Review of Medicine**, v. 52, p. 259-274, 2001.

OLSEN, J. E. et al. Clonal Lines of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Documented by IS200-, Ribo-, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and RFLP Typing. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 15-22, 1994.

OLSTHOORN, M. M. A. et al. Identification of a Novel Core Type in *Salmonella* Lipopolysaccharide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 7, p. 3817-3829, 1998.

OLGUNOĞLU, I. A. *Salmonella* in Fish and Fishery Products. In: MAHMOUD, B. S. M. (Ed.). **Salmonella – A Dangerous Foodborne Pathogen**. Croatia: InTech, 2012. p. 91-108.

PANG, J.-C. et al. A Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Study that Suggests a Major World-Wide Clone of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, n. 3, p. 305-312, 2007.

PARIJA, S. C. *Salmonella*. In: _____. (Org.). **Textbook of Microbiology and Immunology**. Haryana: Elsevier, 2009. p. 279-291.

PENNER, J. L. International Committee on Systematic Bacteriology Taxonomic Subcommittee on *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 2, p. 223-224, 1988.

PERESI, J. T. M. et al. Surtos de Enfermidades Transmitidas por Alimentos Causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

POPPE, C. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 107-132.

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. Genus XXXIII: *Salmonella*. In: GARRITY, G. M. et al. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria**. New York: Springer, 2005. p. 764-799.

PUI, C. F. et al. *Salmonella*: A Foodborne Pathogen. **International Food Research Journal**, v. 18, p. 465-473, 2011.

PULICKAL, A. S. et al. Kinetics of the Natural, Humoral Immune Response to *Salmonella enterica* Serovar Typhi in Kathmandu, Nepal. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 10, p. 1413-1419, 2009.

RADKOWSKI, M. Effect of Moisture and Temperature on Survival of *Salmonella* Enteritidis on Shell Eggs. **Archive Geflügelk**, v. 66, n. 3, p. 119-123, 2002.

RADTKE, A. L. et al. Analysis of Interactions of *Salmonella* Type Three Secretion Mutants with 3-D Intestinal Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 1-12, 2010.

RAETZ, C. R. H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide Endotoxins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 71, p. 635-700, 2002.

RAFFATELLU, M. et al. Clinical Pathogenesis of Typhoid Fever. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 4, p. 260-266, 2008.

RANK, D. L.; SAEED, M. A.; MURIANA, P. M. Cloning of *Salmonella* Enteritidis Fimbrial Protein SefA as a Surface Protein in *Escherichia coli* Confers Attachment to Eukaryotic Cell Lines. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 20, p. 6622-6625, 2009

REEVES, M. W. et al. Clonal Nature of *Salmonella typhi* and Its Genetic Relatedness to Other *Salmonellae* as Shown by Multilocus Enzyme Electrophoresis, and Proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 313-320, 1989.

REIS, R. S.; HORN, F. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia*: Cellular Aspects of Host Bacteria Interactions in Enteric Diseases. **Gut Pathogens**, v. 2, n. 8, p. 1-12, 2010.

RELLER, M. E. et al. Sexual Transmission of Typhoid Fever: A Multistate Outbreak Among Men Who Have Sex with Men. **Clinical Infectious Diseases**, v. 37, n. 1, p. 141-144, 2003.

RIBOT, E. F. et al. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59-67, 2006.

RICKE, S. C. The Gastrointestinal Tract Ecology of *Salmonella* Enteritidis Colonization in Molting Hens. **Poultry Science**, v. 82, n. 6, p. 1003-1007, 2003.

RON, E. Z. Bacterial Stress Response. In: DWORKIN, M. et al. (Eds.). **The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**. New York: Springer, 2006. p. 1012-1027.

RYCROFT, A. N. Structure, Function and Synthesis of Surface Polysaccharides in *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 19-33.

SAMPATHKUMAR, B.; KHACHATOURIANS, G. G.; KORBER, D. R. Treatment of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis with a Sublethal Concentration of Trisodium Phosphate or Alkaline pH Induces Thermotolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4613-4620, 2004.

SANTOS, R. L. et al. Life in the Inflamed Intestine, *Salmonella* Style. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 498-506, 2009.

SANTOS, R. L. et al. Morphologic and Molecular Characterization of *Salmonella typhimurium* Infection in Neonatal Calves. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 200-215, 2002.

SANTOS, R. L. et al. Pathogenesis of *Salmonella*-Induced Enteritis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 1, p. 3-12, 2003.

SANTOS, R. L.; BÄUMLER, A. J. Cell Tropism of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 294, p. 225-233, 2004.

SARAVIA-GOMES, J.; FOCACCIA, R. Febre Tifóide e Paratifóide. In: VERONESI, R. (Ed.). **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. p. 401.

SCALLAN, E. et al. Foodborne Illness Acquired in the United States – Major Pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 1-21, 2011.

SCHAUSER, K.; OLSEN, J. E.; LARSSON, L.-I. Immunocytochemical Studies of *Salmonella* Typhimurium Invasion of Porcine Jejunal Epithelial Cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 691-695, 2004.

SCHIKORA, A. et al. Conservation of *Salmonella* Infection Mechanisms in Plants and Animals. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. 1-10, 2011.

SCHWARTZ, D. C.; CANTOR, C. R. Separation of Yeast Chromosome-Sized DNAs by Pulsed Field Gradient Gel Electrophoresis. **Cell**, v.37, p. 67-75, 1984.

SENIOR, K. Estimating the Global Burden of Foodborne Disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 80-81, 2009.

SETH-SMITH, H. M. B. SPI-7: *Salmonella*'s Vi Encoding Pathogenicity Island. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 2, n. 4, p. 267-271, 2008.

SHACHAR, D.; YARON, S. Heat Tolerance of *Salmonella enterica* Serovars Agona, Enteritidis, and Typhimurium in Peanut Butter. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 11, p. 2687-2691, 2006.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., Importante Agente Patogênico Veiculado em Alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, 2008.

SHRESTHA, S. et al. Survival of *Salmonella* Serovars Introduced as a Post-Aging Contaminant During Storage of Low-Salt Cheddar Cheese at 4, 10, and 21°C. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, p. 616-621, 2011.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SINGER, R. S.; SISCHO, W. M.; CARPENTER, T. E. Exploration of Biases That Affect the Interpretation of Restriction Fragment Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5502-5511, 2004.

SINGH, S. et al. Antibiotic Resistance Pattern Among the *Salmonella* Isolated from Human, Animal and Meat in India. **Tropical Animal Health and Production**, p. 1-10, 2011.

SKERMAN, V. B. D.; MCGOWAN, V.; SNEATH, P. H. A. Approved Lists of Bacterial Names. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 30, p. 225-420, 1980.

SMITH, J. L. The Role of Gastric Acid in Preventing Foodborne Disease and How Bacteria Overcome Acid Conditions. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 7, p. 1292-1303, 2003.

STECHER, B. et al. *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Exploits Inflammation to Compete with the Intestinal Microbiota. **PLoS Biology**, v. 5, n. 10, p. 2177-2189, 2007.

STEIN, C. et al. The Global Burden of Disease Assessments – WHO is Responsible? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 3, p. 1-8, 2007.

STEVENS, M. P.; HUMPHREY, T. J.; MASKELL, D. J. Molecular Insights Into Farm Animal and Zoonotic *Salmonella* Infections. **Philosophical Transactions of The Royal Society**, v. 364, n. 1530, p. 2709-2723, 2009.

SU, L.-H. et al. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid *Salmonella* Serotypes: A Global Challenge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 4, p. 546-551, 2004.

SWAMINATHAN, B. et al. PulseNet: Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 382-389, 2001.

SWAMINATHAN, B. et al. Building PulseNet International: An Interconnected System of Laboratory Networks to Facilitate Timely Public Health Recognition and Response to Foodborne Disease Outbreaks and Emerging Foodborne Diseases. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 36-50, 2006.

TAUNAY, A. E. et al. The Role of Public Health Laboratory in the Problem of Salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 119-127, 1996.

TAUXE, R. V. *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium DT104: Successful Subtypes in the Modern World. In: SCHELD, W. M.; CRAIG, W. A.; HUGHES, J. M. (Eds.). **Emerging Infections 3**. Washington, DC: ASM Press, 1999. p. 37-52.

TEIXEIRA, L. A. As Febres Paulistas. In: _____ **Na Arena de Esculápio: A Sociedade de Medicina e Cirurgia de São Paulo (1895-1913)**. São Paulo: Editora UNESP, 2007. p. 133-162.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233-2239, 1995.

THONG, K. L. et al. Genetic Diversity of Clinical and Environmental Strains of *Salmonella enterica* Serotype Weltevreden Isolated in Malaysia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 7, p. 2498-2503, 2002.

TINDALL, B. J. et al. Nomenclature and Taxonomy of the Genus *Salmonella*. International **Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 521-524, 2005.

TORPDAHL, M. et al. Genotypic Characterization of *Salmonella* by Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Amplified Fragment Length Polymorphism. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, p. 173-184, 2005.

VAZ, C. S. L. et al. Antimicrobial Resistance and Subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis Isolated from Human Outbreaks and Poultry in Southern Brazil. **Poultry Science**, v. 89, n. 7, p. 1530-1536, 2010.

VIALA, J. P. M. et al. Sensing and Adaptation to Low pH Mediated by Inducible Amino Acid Decarboxylases in *Salmonella*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. 1-12, 2011.

WALTMAN, S. D. Methods for the Cultural Isolation of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 355-372.

WATSON, K. G.; HOLDEN, D. W. Dynamics of Growth and Dissemination of *Salmonella In Vivo*. **Celular Microbiology**, v. 12, n. 10, 2010.

WATTIAU, P; BOLAND, C.; BERTRAND, S. Methodologies for *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Subtyping: Gold Standards and Alternatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7877-7885, 2011.

WEIDE-BOTJES, M. et al. Molecular Typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Hadar: Evaluation and Application of Different Typing Methods. **Veterinary Microbiology**, v. 61, n.3, p. 215-227, 1998.

WINN, W. C.; KONEMAN, E. W. As *Enterobacteriaceae*. In: _____. (Orgs.). **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. p. 208-290.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug Resistant *Salmonella***. 2005. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>. Acesso em: 27 jan. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory Protocol “Isolation of *Salmonella* spp. from Food and Animal Faeces”**. 2010. Disponível em: http://www.antimicrobialresistance.dk/data/images/protocols/isolation_of_salm_220610.pdf. Acesso em: 27 jan. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Top 15 List from a Country**. Disponível em: http://thor.dfvf.dk/pls/portal!/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show. Acesso em: 09 ago. 2011.

WONG, D. M. A et al. Epidemiology and Control Measures for *Salmonella* in Pigs and Pork. **Livestock Production Science**, v. 76, p. 215-222, 2002.

WU, F.; DELLA-LATTA, P. Pulsed-Field Gel Electrophoresis. In: TANG, Y.-W.; STRATTON, C. W (Eds.). **Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology**. New York: Springer, 2006. p. 143-157.

YAMASAKI, S. et al. Lysine Decarboxylase-Negative *Salmonella enterica* serovar Enteritidis: Antibiotic Susceptibility, Phage and PFGE Typing. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 8, p. 813-818, 2007.

ZEE, H.; VELD, J. H. J. H. Methods for the Rapid Detection of *Salmonella*. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Eds.). **Salmonella in Domestic Animals**. New York: CABI Publishing, 2000. p. 373-391.

ZHANG, S. et al. Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 1-12, 2003.

ZHENG, J. et al. Simultaneous Analysis of Multiple Enzymes Increases Accuracy of Pulsed-Field Gel Electrophoresis in Assigning Genetic Relationships among Homogeneous *Salmonella* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 85-94, 2011.

ZOU, M.; KEELARA, S.; THAKUR, S. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 3, p. 232-238, 2012.

5.1 Anexo I – Normas para publicação do artigo

Instructions for Authors

Over the past three years, the journal *Microbial Ecology* has been revamped to provide an international forum for the presentation of high-quality scientific investigations into microbial ecology, and how microorganisms interact with their biotic and abiotic environments, with each other as well as with their neighbors and hosts. The journal presents high quality peer reviewed manuscripts in multiple formats inclusive of full-length manuscripts, commentaries and notes. Brief reviews and topical position papers are also encouraged. The journal has a rapid average turn around rate of 6 weeks.

Journal coverage includes the ecology of microorganisms in natural and engineered environments; genomic, metagenomic and molecular advances in understanding of microbial interactions and phylogeny; microbial drivers of biogeochemical processes; inter- and intraspecific microbial communication; ecological studies of animal, plant and insect microbiology and disease; microbial processes and interactions in extreme or unusual environments; microbial population and community ecology, and more. Technological advances that allow us to increase our understanding of microbial diversity and interactions are also welcome.

Other topics that are covered in our journal include.

1. Pathogens in the environment
2. Key players in the carbon cycle and aquatic ecosystems
3. Phage plasmids and mobile elements in ecology
4. Biofilms
5. Soil-microbe interactions
6. Technology developments to study microbial ecology
7. Host microbe interactions
8. Aquatic Microbiology

9. Genes and Genomes

10. Microbial Evolution

TYPES OF PAPERS

Original Research, Reviews, Short Communications.

Introduction

The introduction should provide with sufficient background information to introduce the reader into the reported study. It should also state the research hypothesis or the rationale for the reported study.

Materials and Methods

This section should provide the reader with information sufficient for reproducing of the reported experiments. For commonly used materials and methods, a reference should be provided.

Results

Only the experimental results should be reported in this section.

Discussion

The obtained data interpretation should be presented in the Discussion section. The authors should avoid repetition of Introduction and Results in this section.

Additional Information

Use of Human Subjects or Animals in Research

The use of human subjects or other animals for research purposes is regulated by the federal government and individual institutions. Manuscripts containing information related to human or animal use should clearly state that the research has complied with all relevant federal guidelines and institutional policies.

Nucleotide and Amino Acid Sequences

Newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data should be deposited and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers should be included in the manuscript. The accession numbers should be provided at the end of the Materials and Methods.

Protein Data Deposition

New structures of macromolecules should be deposited in the Protein Data Bank and that assigned identification codes should be included in the manuscript. The accession number(s) should be provided at the end of the Materials and Methods.

Chemical and Biochemical Nomenclature

The authors should refer to The Merck Index, 14th ed. (Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ, 2006). For biochemical terminology, the authors are advised to follow the rules as they are outlined in the instructions to authors of the Journal of Biological Chemistry and the Archives of Nomenclature of Microorganisms

In the case of binary names, a specific epithet must be preceded by a generic name, written out in full the first time it is used in a paper (e.g., *Listeria monocytogenes*). From then on, the generic name should be abbreviated (e.g., *L. monocytogenes*), provided there can be no confusion with other genera used in the paper.

This is a list of abbreviations currently in use for common generic names:

Acet., *Acetobacter*; Ac., *Acinetobacter*; Act., *Actinomyces*; Aer., *Aeromonas*; Ag., *Agrobacterium*; Alc., *Alcaligenes*; Alt., *Alteromonas*;

B., *Bacillus*; Bact., *Bacteroides*; Bord., *Bordetella*; Bran., *Branhamella*; Br., *Brucella*;

Camp., *Campylobacter*; Cit., *Citrobacter*; Cl., *Clostridium*; Coryne., *Corynebacterium*; Cyt., *Cytophaga*;

Des., *Desulfomonas* or *Desulfovibrio* (spell out if both appear in same paper);

Edw., *Edwardsiella*; Ent., *Enterobacter* or *Enterococcus* (spell out if both appear in same paper);

Erw., *Erwinia*; E., *Escherichia*; Eu., *Eubacterium*;

Fl., *Flavobacterium*; Fus., *Fusobacterium*;

G., Gemella;

H., Haemophilus;

Kl., Klebsiella; Lact., Lactobacillus;

L., Lactococcus; Leg., Legionella; Leuc., Leuconostoc; L., Listeria;

Meth., Methanobacterium or Methanococcus (spell out if both appear in same paper); Mic., Microbacterium; M., Micrococcus; Mor., Moraxella; Myco., Mycobacterium; Myc., Mycoplasma;

N., Neisseria; Nit., Nitrobacter or Nitrosomonas (spell out if both appear in same paper); Noc., Nocardia;

Past., Pasteurella; Ped., Pediococcus; Ple., Plesiomonas; Pr., Proteus; Ps., Pseudomonas;

Rh., Rhizobium; R., Ruminococcus;

Salm., Salmonella; Ser., Serratia; Sh., Shigella; Staph., Staphylococcus; Strep., Streptococcus; S., Streptomyces;

T., Thiobacillus;

V., Vibrio;

X., Xanthomonas;

Y., Yersinia.

Genus, species, and subspecies names should be rendered in standard form: *Escherichia coli* at first use, *E. coli* thereafter; *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* at first use, *L. lactis* subsp. *lactis* thereafter. Names of serovars should be in roman type with the first letter capitalized: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. The spelling of bacterial names should follow the Approved Lists of Bacterial Names (Amended) & Index of the Bacterial and Yeast Nomenclatural Changes (V. B. D. Skerman et al., ed., ASM Press, Washington, DC, 1989) and the validation lists and notification lists published in the International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (formerly the International Journal of Systematic Bacteriology) since January 1989. In addition, two sites on the World Wide Web list current approved bacterial names: Bacterial

Nomenclature Up-to-Date

(http://www.dsmz.de/microorganisms/main.php?contentleft_id=14) and List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/>). If there is reason to use a name that does not have standing in nomenclature, the name should be enclosed in quotation marks in the title and at its first use in the abstract and the text and an appropriate statement concerning the nomenclatural status of the name should be made in the text. "Candidatus" species should always be set in quotation marks.

Conflict of interest and Ethical standards

Conflict of interest

When an author or the institution of the author has a relationship, financial or otherwise, with individuals or organizations that could influence the author's work inappropriately, a conflict of interest may exist. Examples of potential conflicts of interest may include but are not limited to academic, personal, or political relationships; employment; consultancies or honoraria; and financial connections such as stock ownership and funding. Although an author may not feel that there are conflicts, disclosure of relationships and interests that could be viewed by others as conflicts of interest affords a more transparent and prudent process. All authors for Chemosensory Perception must disclose any actual or potential conflict of interest. The Journal may publish such disclosures if judged to be important to readers.

Ethical Standards – Informed consent

Manuscripts containing the results of experimental studies on human participants must disclose in the Methods section whether informed consent was obtained from patients in the study after the nature of the procedure had been fully explained to them. If informed consent was waived by the institutional review board (IRB) for a study, that should be so stated. In addition, a statement affirming approval of the IRB should be included, if approved. The patient's right to privacy should not be infringed. Information that would identify patients should not be published.

Ethical Standards – Animal rights

Authors are advised to comply with the guidelines for the care and use of laboratory animals as described by the U.S. National Institutes of Health and to acknowledge their compliance with these guidelines in the Methods section of the manuscript.

Manuscript Submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author

Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Word template (zip, 154 kB)
Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.
- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

Headings

Please use the decimal system of headings with no more than three levels.

Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- **Journal article**

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

- Article by DOI
Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med.* doi:10.1007/s001090000086
- Book
South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics.* Blackwell, London
- Book chapter
Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257
- Online document
Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007
- Dissertation
Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure.* Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal's name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `spbasic.bst` which is included in Springer's LaTeX macro package.

Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.
- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.

- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

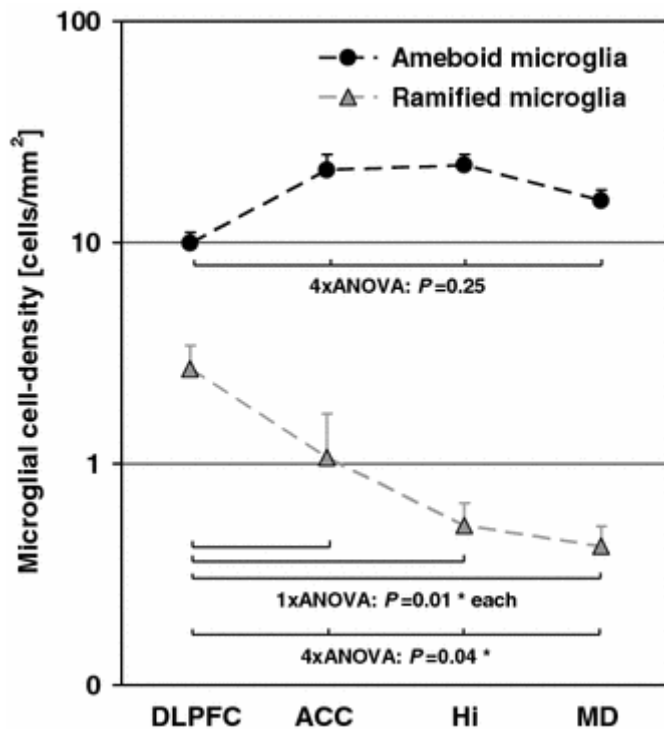
Artwork and Illustrations Guidelines

For the best quality final product, it is highly recommended that you submit all of your artwork – photographs, line drawings, etc. – in an electronic format. Your art will then be produced to the highest standards with the greatest accuracy to detail. The published work will directly reflect the quality of the artwork provided.

Electronic Figure Submission

- Supply all figures electronically.
- Indicate what graphics program was used to create the artwork.
- For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MS Office files are also acceptable.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.
- Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

Line Art



- Definition: Black and white graphic with no shading.
- Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.
- All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.
- Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.
- Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Halftone Art

- Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.
- If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.
- Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

Combination Art

- Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.
- Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

Color Art

- Color art is free of charge for online publication.
- If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.
- If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions.
- Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

Figure Lettering

- To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).
- Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

- Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.
- Avoid effects such as shading, outline letters, etc.
- Do not include titles or captions within your illustrations.

Figure Numbering

- All figures are to be numbered using Arabic numerals.
- Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.
- Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).
- If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

Figure Captions

- Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.
- Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.
- No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.
- Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.
- Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

Figure Placement and Size

- When preparing your figures, size figures to fit in the column width.
- For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.
- For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

Permissions

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

- All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)
- Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (color-blind users would then be able to distinguish the visual elements)
- Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

Electronic Supplementary Material

Springer accepts electronic multimedia files (animations, movies, audio, etc.) and other supplementary files to be published online along with an article or a book chapter. This feature can add dimension to the author's article, as certain information cannot be printed or is more convenient in electronic form.

Submission

- Supply all supplementary material in standard file formats.
- Please include in each file the following information: article title, journal name, author names; affiliation and e-mail address of the corresponding author.
- To accommodate user downloads, please keep in mind that larger-sized files may require very long download times and that some users may experience other problems during downloading.

Audio, Video, and Animations

- Always use MPEG-1 (.mpg) format.

Text and Presentations

- Submit your material in PDF format; .doc or .ppt files are not suitable for long-term viability.
- A collection of figures may also be combined in a PDF file.

Spreadsheets

- Spreadsheets should be converted to PDF if no interaction with the data is intended.
- If the readers should be encouraged to make their own calculations, spreadsheets should be submitted as .xls files (MS Excel).

Specialized Formats

- Specialized format such as .pdb (chemical), .wrl (VRML), .nb (Mathematica notebook), and .tex can also be supplied.

Collecting Multiple Files

- It is possible to collect multiple files in a .zip or .gz file.

Numbering

- If supplying any supplementary material, the text must make specific mention of the material as a citation, similar to that of figures and tables.
- Refer to the supplementary files as “Online Resource”, e.g., "... as shown in the animation (Online Resource 3)", "... additional data are given in Online Resource 4”.
- Name the files consecutively, e.g. “ESM_3.mpg”, “ESM_4.pdf”.

Captions

- For each supplementary material, please supply a concise caption describing the content of the file.

Processing of supplementary files

- Electronic supplementary material will be published as received from the author without any conversion, editing, or reformatting.

Accessibility

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your supplementary files, please make sure that

- The manuscript contains a descriptive caption for each supplementary material
- Video files do not contain anything that flashes more than three times per second (so that users prone to seizures caused by such effects are not put at risk)

After Acceptance

Upon acceptance of your article you will receive a link to the special Author Query Application at Springer's web page where you can sign the Copyright Transfer Statement online and indicate whether you wish to order OpenChoice, offprints, or printing of figures in color.

Once the Author Query Application has been completed, your article will be processed and you will receive the proofs.

Open Choice

In addition to the normal publication process (whereby an article is submitted to the journal and access to that article is granted to customers who have purchased a subscription), Springer provides an alternative publishing option: Springer Open Choice. A Springer Open Choice article receives all the benefits of a regular subscription-based article, but in addition is made available publicly through Springer's online platform SpringerLink.

- Springer Open Choice

Copyright transfer

Authors will be asked to transfer copyright of the article to the Publisher (or grant the Publisher exclusive publication and dissemination rights). This will ensure the widest possible protection and dissemination of information under copyright laws.

Open Choice articles do not require transfer of copyright as the copyright remains with the author. In opting for open access, the author(s) agree to publish the article under the Creative Commons Attribution License.

Offprints

Offprints can be ordered by the corresponding author.

Color illustrations

Online publication of color illustrations is free of charge. For color in the print version, authors will be expected to make a contribution towards the extra costs.

Proof reading

The purpose of the proof is to check for typesetting or conversion errors and the completeness and accuracy of the text, tables and figures. Substantial changes in content, e.g., new results, corrected values, title and authorship, are not allowed without the approval of the Editor.

After online publication, further changes can only be made in the form of an Erratum, which will be hyperlinked to the article.

Online First

The article will be published online after receipt of the corrected proofs. This is the official first publication citable with the DOI. After release of the printed version, the paper can also be cited by issue and page numbers.

DOES SPRINGER PROVIDE ENGLISH LANGUAGE SUPPORT?

Manuscripts that are accepted for publication will be checked by our copyeditors for spelling and formal style. This may not be sufficient if English is not your native language and substantial editing would be required. In that case, you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in:

Medicine, biomedical and life sciences, chemistry, physics, engineering, business/economics, and humanities

- Edanz Editing Global

Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication.

Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment.

SCIENTIFIC STYLE

Please always use internationally accepted signs and symbols for units, SI units.

Molecular Characterization and Antibiotic Susceptibility Profile of *Salmonella* Isolates from Seven Brazilian States

Abstract We characterized the phenotypic and genotypic diversity of 87 *Salmonella* spp. isolates collected from March 2010 to March 2011 in seven Brazilian States. The isolates were submitted to serotyping, to antibiotic susceptibility test by broth microdilution, and Pulsed Field Gel Electrophoresis. Sixteen serotypes were identified, and *Salmonella* serotypes Enteritidis (19,54%), Infantis (16,09%), Minnesota (13,79%), Corvallis (12,64%), Schwarzengrund (11,49%) and Typhimurium (8,05%) were, respectively, the most common. *Salmonella* serotypes Infantis and Typhimurium were isolated from human stool and poultry's. Seventy one isolates (81,61%) were resistant to one or more antibiotics. The highest resistance rates were registered against trimethoprim-sulfamethoxazole (63,22%), tetracycline (29,89%) and ampicillin (18,39%). Multidrug resistance patterns were observed in 11 poultry isolates. *Salmonella* serotypes Enteritidis, Infantis, Minnesota, Typhimurium, Heidelberg and Schwarzengrund were related to PFGE patterns spread in different States, suggesting the existence of a common origin and the circulation of these clones among these regions. *Salmonella* serotype Infantis shared the same clonal pattern among isolates from stool and poultry's samples. These results indicate the wide distribution of serotypes, clonal patterns and antibiotic resistance among the isolates, with frequent exposure of susceptible to contaminations and recontaminations. Moreover, the co-circulation of isolates with different resistance patterns can favor the resistance genes acquisition, allowing the emergence of multidrug-resistance strains. The understanding about origin, route transmission and relation among *Salmonella* spp. hosts allows the precocious identification of outbreaks and of potential resistance patterns, enabling the use of preventive actions and the control of the outbreaks.

Introduction

With worldwide distribution, the non-typhoidal *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotypes are among the major foodborne pathogens [1, 2]. *Salmonella* colonizes the intestinal tract of a wide range of susceptible hosts, which can act as asymptomatic carriers, keeping the bacteria in the environment, from which it is transmitted to other hosts [3].

Poultry are commonly related as reservoirs of non-typhoidal *Salmonella* serotypes and an important source of human infections [4-6]. In Brazil, studies have suggested a route of transmission from poultry to humans through genetic relation found among strains which were isolated from these hosts [7, 8].

The selective pressure used by the widespread use of antibiotics such in human therapy as in agriculture industry like growth promoters or even to prophylactic and therapeutic proposals has favored the emergence of multidrug resistant strains representing a risk to public health [9-11].

Multi-drug resistant strains generally have a greater virulence potential and, consequently, cause invasive infections [12, 13]. Under these conditions, the illness treatment is hampered due to the limited therapeutic options, resulting in an increasing of the rates of morbidity and mortality and also of the hospitalization costs and labor disability [2, 14].

The Brazilian agro industry stands out as one of the greatest meat supplier to the world [15] and the current system of food's production and mass distribution contributes to an easy spread of the strains [16]. The

explaining of the pathogen source and its dissemination through the transmission chain is of fundamental importance for the measures of prevention and control.

Phenotypic and genotypic methods are crucial tools for the characterization of such strains. Within the various methods of genetic typing, the Pulsed Field Gel Electrophoresis stands out as the gold standard method for bacterial typing, due to its high discriminatory power, broad applicability and epidemiological concordance [17, 18]. This study aimed to determine the serotypes, the antibiotic susceptibility profile and the clonal patterns generated by PFGE of *Salmonella* spp. isolates collected from March 2010 to March 2011, from seven Brazilian States.

Methods

Bacterial Isolates

A total of 87 *Salmonella* spp. isolates, collected between March 2010 and March 2011, in seven Brazilian States – Distrito Federal (DF), Mato Grosso (MT), Mato Grosso do Sul (MS), Minas Gerais (MG), São Paulo (SP), Paraná (PR) and Santa Catarina (SC) – were included in this study. Eighty four isolates were obtained from poultry products (meat poultry mechanically separated, poultry carcass and viscera) and three isolates were obtained from human poultry. The poultry products isolates were provided by a private laboratory and by a laboratory of research from Universidade Federal da Grande Dourados (Dourados, State of Mato Grosso do Sul). The human stool isolates were collected from

patients with intestinal infection from Hospital Universitário da Grande Dourados (Dourados, State of Mato Grosso do Sul) and provided by the Microbiology Laboratory of such hospital.

All these isolates were identified by biochemical and serological tests [19-21].

Salmonella Serotyping

All the isolates previously identified as *Salmonella* spp. were sent to the Enterobacteria Laboratory of Oswaldo Cruz Institute (FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) to definitive identification through serotyping.

Antibiotic Susceptibility Testing

The *Salmonella* spp. isolates were investigated for their antibiotic susceptibility by the broth microdilution method according to the M100-S21 document of the Clinical and Laboratory Standards Institute [22], using *Salmonella* ser. Enteritidis ATCC 13076 as reference strain. All the isolates were tested with the following antibiotics: ampicillin (AMP), chloramphenicol (CHL), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GEN), norfloxacin (NOR), tetracycline (TET) and trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT). The results were interpreted by considering the breakpoints disclosed in the M100-S22 document of the CLSI [23].

Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

Pulsed-field gel electrophoresis was performed based on PulseNet protocol, from the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) [17], with modifications: 1) the XbaI enzyme (Invitrogen, Carlsbad, CA) amount used for DNA digestion was changed from 40-50 U per plug to 20 U per plug and 2) the incubation period was increased from 2 hours to 16 hours.

The PFGE patterns were compared by BioNumerics software version 6.6 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) and designated through letters and subtypes profiles (with one to three different restriction fragments) marked by a numerical suffix (ex.: A1, A2, etc.).

Results

Serotyping

All the isolates were identified as *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, from which two isolated

from poultry from MS and PR haven't showed detectable flagellar structure, classified as rough strains. The other isolates were classified into 16 serotypes, from which the most found ones were *Salmonella* serotypes Enteritidis (19,54%), Infantis (16,09%), Minnesota (13,79%), Corvallis (12,64%), Schwarzengrund (11,49%) and Typhimurium (8,05%; Table 1).

Salmonella serotypes Infantis and Typhimurium were found in human stool and poultry. The other serotypes were found exclusively in poultry isolates.

Antibiotic Susceptibility

Among the 87 isolates, twelve of them (13,79%), from poultry origin, were sensitive to all tested antibiotics. All the isolates were susceptible to CIP, CHL and NOR.

Three isolates from poultry (3/84) showed only intermediate resistance to GEN and the intermediate resistance to TET was observed in another poultry isolate. The resistance to one or more antibiotics was observed in the three human stool isolates and in 68 poultry isolates, totalizing 81,61% of the total number of isolates.

The highest rates of resistance were registered against SXT (63,22%), TET (29,89%) and AMP (18,39%). GEN had the lowest resistance rate (8,05%). GEN and TET showed also 25,29% and 1,15% of intermediate resistance, respectively.

We identified 15 antibiotic resistance patterns (ARP), from which the predominant pattern was the ARP1 (resistance to SXT), found in both States of this study (Table 2).

Salmonella serotype Minnesota showed 100% of resistance (12/12), followed by 90,91% of resistance from *Salmonella* ser. Corvallis (10/11), 90% of resistance from *Salmonella* ser. Schwarzengrund (9/10), 78,57% of resistance from *Salmonella* ser. Infantis (11/14), 76,47% of resistance from *Salmonella* ser. Enteritidis (13/17) and 71,43% of resistance from *Salmonella* ser. Typhimurium (5/7).

Multidrug-resistance (MDR) profiles were observed in 11 poultry isolates (12,64%): 1) four isolates from ARP4 (resistance to AMP, GEN, TET and SXT), 2) three isolates from ARP5 (resistance to AMP, TET and SXT), 3) three isolates from ARP6 (resistance to AMP, TET and SXT and intermediate resistance to GEN) and 4) one isolate from ARP14 (resistance to GEN, TET and SXT, Table 3).

Salmonella ser. Typhimurium showed the highest rate of MDR (4/11), followed by *Salmonella* serotypes Minnesota and Enteritidis (2/11 each), Corvallis, Infantis and Senftenberg (1/11 each).

Table 1 Distribution of *Salmonella* serotypes in poultry and human stool in seven Brazilian states

Serotype	State							Total of isolates
	DF	MT	MS	MG	SP	PR	SC	
<i>Salmonella</i> ser. Agona			1					1
<i>Salmonella</i> ser. Anatum				1				1
<i>Salmonella</i> ser. Corvallis						11		11
<i>Salmonella</i> ser. Derby						1		1
<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	4				2	10	1	17
<i>Salmonella</i> ser. Give						1	1	2
<i>Salmonella</i> ser. Heidelberg				2				2
<i>Salmonella</i> ser. Infantis			12*			1	1	14
<i>Salmonella</i> ser. Livingstone						2		2
<i>Salmonella</i> ser. Minnesota		1	8	1		2		12
<i>Salmonella</i> ser. Muenchen	1			1				2
<i>Salmonella</i> ser. Newport				1				1
<i>Salmonella</i> ser. Schwarzengrund		2	1		1	6		10
<i>Salmonella</i> ser. Senftenberg			1					1
<i>Salmonella</i> ser. Tennessee					1			1
<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	1		3**		1	1	1	7
Rough strain			1			1		2
Total	6	3	27	6	5	36	4	87

DF: Distrito Federal; MT: Mato Grosso; MS: Mato Grosso do Sul; MG: Minas Gerais; SP: São Paulo; PR: Paraná; SC: Santa Catarina

*Two human stool isolates

**One human stool isolate

PFGE

The restriction fragments separated by the PFGE were classified into 23 main patterns that were subdivided into 45 PFGE profiles. The clonal pattern more found was the A (18,39%), followed by the patterns C (14,94%), F (13,79%), B (12,64%) and D (8,05%). Thirteen patterns (56,52%) showed only one isolate (Fig. 1).

The pattern A was represented exclusively by *Salmonella* ser. Enteritidis isolates, from poultry, of DF (3/16), SP (2/16), PR (10/16) and SC (1/16). Two isolates were considered MDR, one from DF with ARP4 and other from SP with ARP14.

The pattern C was found in 13 isolates from MS, PR and SC. In MS this pattern was the most frequent, covering 11 of the 27 isolates from the State, and included *Salmonella* ser. Infantis isolates from poultry (9) and from human stool (2). In PR e SC this pattern was represented by *Salmonella* ser. Infantis isolates from poultry. The isolate from SC showed MDR profile (ARP4).

The pattern F was formed by poultry isolates of *Salmonella* serotypes Enteritidis (1/12), Schwarzengrund (10/12) and Typhimurium (1/12), from DF (2/12), MT (2/12), MS (1/12), SP (1/12) and PR (6/12).

In the pattern B were found exclusively 11 *Salmonella* ser. Corvallis isolates, from poultry from Paraná State. The PFGE profile B3 was the most found (5/11) and one of its isolates showed MDR profile, with ARP6.

The pattern D was constituted by poultry isolates of *Salmonella* ser. Minnesota from MT (1/7), MS (4/7), MG (1/7), and PR (1/7). Another four poultry isolates of *Salmonella* ser. Minnesota from MS, constituted the pattern J. Two of these isolates showed MDR, with ARP5.

In the pattern I we observed two *Salmonella* ser. Heidelberg isolates from MG and two rough strains, from MS and PR, all from poultry origin. The pattern L was represented by *Salmonella* ser. Muenchen from poultry from DF (1/2) and MG (1/2) States.

The *Salmonella* ser. Typhimurium isolates were observed in four clonal patterns (E, F, H and Y). The isolates from poultry origin were grouped in the patterns E (3/7), F (1/7) and H (2/7), and the human stool isolate was found in the pattern Y. Two isolates from the pattern E and the two isolates from the pattern H were considered MDR, with ARP 6 and 4, respectively.

Table 2 Distribution of antibiotic resistance pattern (ARP) in poultry and human stool *Salmonella* isolates from seven Brazilian states

ARP	Serotype	State							Total
		DF	MT	MS	MG	SP	PR	SC	
ARP1	<i>Salmonella</i> ser. Agona			1					1
	<i>Salmonella</i> ser. Corvallis						4		4
	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	2				1	3	1	7
	<i>Salmonella</i> ser. Give							1	1
	<i>Salmonella</i> ser. Heidelberg								1
	<i>Salmonella</i> ser. Infantis			5*					4
	<i>Salmonella</i> ser. Minnesota		1						1
	<i>Salmonella</i> ser. Muenchen	1			1				2
	<i>Salmonella</i> ser. Schwarzengrund		1			1	4		6
	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	1		1**					2
	Rough strain						1		1
ARP2	<i>Salmonella</i> ser. Corvallis						4		4
	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis						2		2
	<i>Salmonella</i> ser. Infantis			5					5
ARP3	<i>Salmonella</i> ser. Schwarzengrund		1						1
	<i>Salmonella</i> ser. Corvallis						1		1
	<i>Salmonella</i> ser. Livingstone						2		2
ARP4	<i>Salmonella</i> ser. Minnesota			3					3
	<i>Salmonella</i> ser. Schwarzengrund						1		1
	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	1						1	1
ARP5	<i>Salmonella</i> ser. Infantis							1	1
	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium					1	1		2
	<i>Salmonella</i> ser. Minnesota			2					2
ARP6	<i>Salmonella</i> ser. Senftenberg			1					1
	<i>Salmonella</i> ser. Corvallis						1		1
ARP7	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium			2					2
	<i>Salmonella</i> ser. Minnesota			2			1		3
ARP8	<i>Salmonella</i> ser. Minnesota			1	1				2
ARP9	<i>Salmonella</i> ser. Schwarzengrund						1		1
ARP10	<i>Salmonella</i> ser. Heidelberg				1				1
ARP11	Rough strain			1					1
ARP12	<i>Salmonella</i> ser. Minnesota						1		1
ARP13	<i>Salmonella</i> ser. Corvallis						1		1
ARP14	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis					1			1
ARP15	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis						1		1
Total		5	3	24	3	4	29	3	71

DF: Distrito Federal; MT: Mato Grosso; MS: Mato Grosso do Sul; MG: Minas Gerais; SP: São Paulo; PR: Paraná; SC: Santa Catarina.

ARP1 (resistance to SXT), ARP2 (intermediate resistance to GEN and resistance to SXT), ARP3 (resistance to TET), ARP4 (resistance to AMP, GEN, TET and SXT), ARP5 (resistance to AMP, TET and SXT), ARP6 (intermediate resistance to GEN and resistance to AMP, TET and SXT), ARP7 (resistance to AMP and TET), ARP8 (intermediate resistance to GEN and resistance to TET), ARP9 (resistance to AMP and SXT), ARP10 (resistance to AMP), ARP11 (resistance to GEN and TET), ARP12 (intermediate resistance to GEN and resistance to AMP and TET), ARP13 (intermediate resistance to GEN and resistance to TET and SXT), ARP14 (resistance to GEN, TET and SXT), ARP15 (resistance to GEN).

*Two human stool isolates;

**Human stool isolate.

Discussion

From the 16 serotypes described in this study, 81,61% of the total of isolates were of *Salmonella* serotypes Enteritidis, Infantis, Minnesota, Corvallis, Schwarzengrund and Typhimurium. All these isolates are described among the main serotypes isolated in Brazil, in 2010, according to the World Health Organization (WHO) [24]. Also were isolated

Salmonella serotypes Derby and Livingstone, not included in this list, suggesting wide serotype variability in the seven studied States.

Salmonella ser. Enteritidis is worldwide considered the main serotype involved in human infections [25]. This serotype is widely spread in four of the seven States studied, with MDR isolates, and represents a risk to public health. Brazilian studies since the late 90s have been evidencing the

predominance of *Salmonella* ser. Enteritidis among poultry and human isolates in Brazil, mainly in the

southern region, and current studies show that this serotype is still predominant in this region [8, 27-31].

Table 3 Multidrug-resistance profile distribution of *Salmonella* isolates by serotype, source, state and PFGE pattern

ARP	Serotype	Source	State	PFGE Pattern	Total of Isolates
ARP4	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	Poultry	DF	A	1
	<i>Salmonella</i> ser. Infantis	Poultry	SC	C	1
	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	Poultry	SP	H	1
ARP5	<i>Salmonella</i> ser. Minnesota	Poultry	PR	H	1
	<i>Salmonella</i> ser. Senftenberg	Poultry	MS	J	2
ARP6	<i>Salmonella</i> ser. Corvallis	Poultry	MS	K	1
	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium	Poultry	PR	B	1
ARP14	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	Poultry	MS	E	2
	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	Poultry	SP	A	1

DF: Distrito Federal; MT: Mato Grosso; MS: Mato Grosso do Sul; MG: Minas Gerais; SP: São Paulo; PR: Paraná; SC: Santa Catarina

In this study, *Salmonella* ser. Enteritidis presented the highest rate of isolates in the State of PR, representing 27,78% (10/36) of the isolates from this State and confirming the persistence of this serotype in the southern region of Brazil. However, our study also noted the high rate of *Salmonella* ser. Corvallis in the PR, indicating that this may be an emerging serotype in this region. The States of the southern region represented, in 2010, 62,59% of the Brazilian poultry industry production. The PR State, with 27,77%, was the largest individual poultry producer in this year [15] and there is a great importance in the *Salmonella* ser. Enteritidis transmission from poultry to humans through the food chain [32].

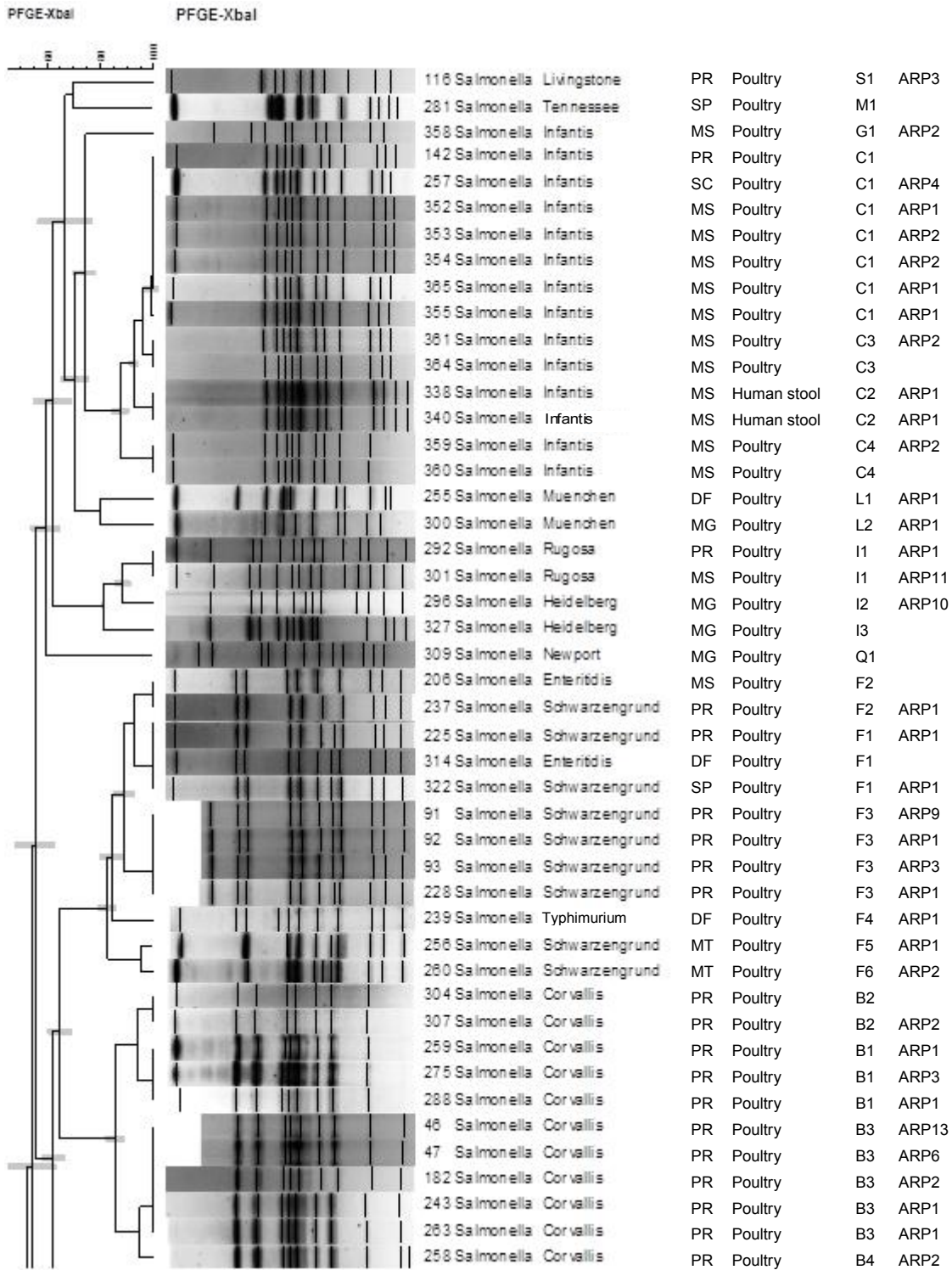
Salmonella ser. Enteritidis was not found in human stool and in other isolates from MS State. *Salmonella* serotype Infantis was the predominant serotype in this State, in both human stool and poultry samples. The human stool isolates of *Salmonella* ser. Infantis showed the same epidemiological distribution pattern of the *Salmonella* ser. Enteritidis isolates in other studies, where there was an increasing of foodborne *Salmonella* ser. Enteritidis isolates, while it was observed a greater number of the isolates from the same serotype in poultry and environmental isolates, with the same geographical and temporal distribution [26, 33]. Considering the lack of *Salmonella* researches in the State of MS, it wasn't possible to conclude if this is a predominant or an emergent serotype in this State.

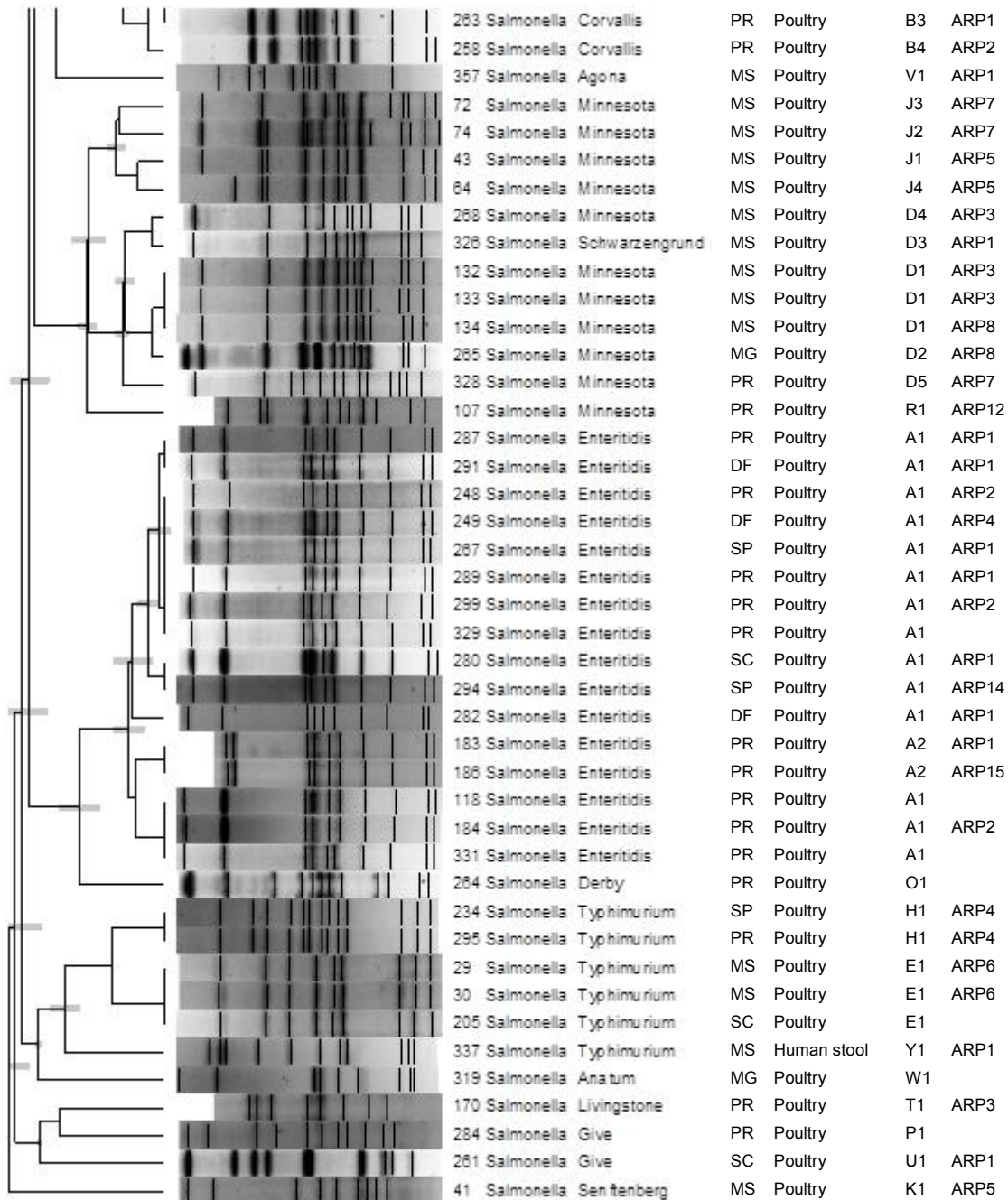
The antibiotic susceptibility tests results showed a high rate of resistance among the isolates, as has been evidenced by recent studies. In the United States, a high number of antibiotic resistance was

observed in isolates of *Salmonella* serotypes Typhimurium and Heidelberg from poultry meat [5, 10, 34]. In a study realized with poultry carcasses in 15 Brazilian capitals, the resistance to one or more antibiotics was observed in all the isolates, and 53,2% of these showed MDR pattern [31].

The indiscriminate use of antibiotics in humans [35, 36] and in food animals [11] is considered one of the main responsible factor for the emergence and increasing of the antibiotic resistance. In Brazil, despite of antibiotics such as penicillin, tetracycline, chloramphenicol and systemic sulfonamides had been banned as growth promoters, they are formally accepted as therapeutic agents in animals (which will be consumed in the future) and widely spread in human therapy [36, 37].

In our study, SXT was the antibiotic that showed the highest rate of resistance. Since it is no longer used as animal growth promoter and the therapeutic human use exceeds the veterinary therapeutic use, it is possible that the human consumption, widespread and indiscriminate of this antibiotic, is associated with the spread of resistant strains. Antibiotics are among the most used drugs without prescription and in empirical treatments. Moreover, the absence or the non-use of therapeutic protocols and the disability criteria in prescribing collaborate to an inappropriate use of antibiotics [38-40]. The incorrect administration of drugs affects the intestinal microbiota, even in the absence of selective pressure, selecting resistant strains which can be easily disseminated to the environment and also to animals [41].





We have detected antibiotic resistance in different serotypes, isolated in different geographical regions, evidencing the circulation of several resistance genes in bacteria with distinct pathogenic pattern, what favors the emergence of MDR bacteria.

We found 11 isolates with MDR profile. Two *Salmonella* ser. Typhimurium isolates, from poultry, with the same PFGE pattern and ARP, were isolated from different geographical regions, which suggests the dissemination of MDR clones among the productive regions.

The PFGE data showed that some clonal

patterns corresponded exactly with the serotypes, as observed by Gaul et al. [42] and Zou et al. [9]. However, *Salmonella* serotypes Enteritidis, Infantis, Minnesota and Typhimurium showed more than one clonal pattern, suggesting the genetic variability of these serotypes, even within the same geographical region.

Salmonella serotypes Enteritidis, Infantis, Minnesota, Typhimurium and Schwarzengrund were related to clonal patterns spread in different States, indicating a common source and the circulation of these clones among these regions.

Salmonella serotypes Enteritidis and Schwarzengrund shared the same PFGE profile (F1) and were closely related to a *Salmonella* serotype Typhimurium isolate (F4). This is possible since one or more nucleotide can change the transcriptional signals or the genes reading encoding the surface antigens used for serotypes discrimination [43, 44].

In the clonal pattern I, two rough strains and two *Salmonella* ser. Heidelberg isolates were reported. Rough strains can exhibit similar fingerprints, because they can lose the phenotype but preserve the same genotype of its original strain [45].

The *Salmonella* ser. Infantis isolates from human stool shared the clonal pattern C with poultry isolates, in MS State. And, the same clonal pattern was also reported in poultry isolates from PR and SC States, what indicate the participation of the poultry meat production chain as a disseminator of this clone. Although the isolates demonstrate indicative of parallel evolution, due to the different ARP; it's possible that these ARP differences are due to point mutations or minor genetic alterations, unable to change de PFGE patterns [44].

One of the limitations of this study was the small number of samples of some States, impossible to carry out statistical associations. Another limitation is due to the small number of human samples and also to the fact that these were obtained from a single State. Thus, it was not possible to determine cleared associations on transmission of *Salmonella* between humans and animals. Furthermore, the use of a single restriction enzyme may have reduced the discriminatory power of PFGE.

Despite these limitations, in the overview, the PFGE results showed that in Brazil, the Salmonellae present geographical grouping, since there was predominance of certain clonal patterns in certain States. However, the isolates diversity from different serotypes, ARP and PFGE patterns observed suggest geographical and host distribution, with frequent exposure of susceptible to contaminations and recontaminations. The co-circulation of isolates with different resistance patterns, can favor resistance genes acquisition, allowing the emergence of MDR strains.

The implementation of surveillance systems, using the PFGE as epidemiological investigation tool can enhance the understanding about the origin and the routes of transmission of *Salmonella* spp. and the relations among their different hosts. Furthermore, it is possible the early identification of outbreaks and potential resistance patterns, enabling the use of prevention actions and the control of outbreaks.

Acknowledgments: We thank Flávia Patussi Correia Sacchi and Kelly Mari Pires de Oliveira by the availability of *Salmonella* spp. isolates. We also thank Eliane Moura Falavina dos Reis, from the Laboratory of Enterobacteria of the Oswaldo Cruz Institute, by the serotyping, and Joice Neves Reis Pedreira and the Gonçalo Moniz Research Center by the PFGE assistance. We also thank National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Support Foundation to Development of Education, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT), which provided financial support.

References

1. Hendriksen R, Karlsmose S, Jensen AB, Aarestrup F (2009) The External Quality Assurance System of the WHO Global Salm-Surv Year 2008.
2. Majowicz SE, Musto J, Scallan E, Angulo FJ, Kirk M, O'Brien SJ, Jones TF, Fazil A, Hoekstra RM, International Collaboration on Enteric Disease Burden of Illness S (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clin Infect Dis* 50: 882-889.
3. Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor Hidayah MS, Ubong A, Farinazleen MG, Cheah YK, Son R (2011) *Salmonella: a foodborne pathogen*. *Int Food Res J* 18: 465-473.
4. Fearnley E, Raupach J, Lagala F, Cameron S (2011) *Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008. *International journal of food microbiology* 146: 219-227.
5. Han J, David DE, Deck J, Lynne AM, Kaldhone P, Nayak R, Stefanova R, Foley SL (2011) Comparison of *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Human Patients with Those from Animal and Food Sources. *Journal of Clinical Microbiology* 49: 1130-1133.
6. Kabir SML (2010) Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. *Int J Env Res Pub He* 7: 89-114.
7. Fernandes SA, Paterson DL, Ghilardi-Rodrigues AC, Adams-Haduch JM, Tavechio AT, Doi Y (2009) CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microbial drug resistance* 15: 317-321.
8. Vaz CS, Streck AF, Michael GB, Marks FS, Rodrigues DP, Dos Reis EM, Cardoso MR, Canal CW (2010) Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis isolated

- from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poult Sci* 89: 1530-1536.
9. Zou W, Lin WJ, Foley SL, Chen CH, Nayak R, Chen JJ (2010) Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis profiles for identification of *Salmonella* serotypes. *J Clin Microbiol* 48: 3122-3126.
 10. M'ikanatha NM, Sandt CH, Localio AR, Tewari D, Rankin SC, Whichard JM, Altekruze SF, Lautenbach E, Folster JP, Russo A, Chiller TM, Reynolds SM, McDermott PF (2010) Multidrug-Resistant *Salmonella* Isolates from Retail Chicken Meat Compared with Human Clinical Isolates. *Foodborne pathogens and disease* 7: 929-934.
 11. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, Nightingale C, Preston R, Waddell J (2004) Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemoth* 53: 28-52.
 12. Beutlich J, Jahn S, Malorny B, Hauser E, Huhn S, Schroeter A, Rodicio MR, Appel B, Threlfall J, Mevius D, Helmuth R, Guerra B, Med-Vet-Net WPPG (2011) Antimicrobial resistance and virulence determinants in European *Salmonella* genomic island 1-positive *Salmonella enterica* isolates from different origins. *Applied and environmental microbiology* 77: 5655-5664.
 13. Onyango DM, Kakai R, Nyandago WE, Ghebremedhin B, Konig W, Kong B (2010) Integron-plasmid mediated antibiotic resistance and virulence factors in clinical *Salmonella enterica* serovars in rural Western Kenya. *Afr J Pharm Pharmacol* 4: 490-497.
 14. Zali MR, Alebouyeh M, Tajbakhsh M (2011) Emergence of resistant *Salmonella* spp.; new challenges, new trends. *Gastr Hepatol Bed Bench* 4: 99-101.
 15. (UBABEF) UBdA (2011) Relatório Anual 2010/2011. <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiababef.php?notcodigo=2761>.
 16. DuPont HL (2007) The growing threat of foodborne bacterial enteropathogens of animal origin. *Clin Infect Dis* 45: 1353-1361.
 17. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ (2006) Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne pathogens and disease* 3: 59-67.
 18. Foley SL, Zhao S, Walker RD (2007) Comparison of molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* foodborne pathogens. *Foodborne pathogens and disease* 4: 253-276.
 19. Popoff MY, Le Minor LE (2005) Genus XXXIII: *Salmonella*. In: Garrity, GM (ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 edn. Springer, New York, pp. 764-799
 20. Waltman S (2000) Methods for the Cultural Isolation of *Salmonella*. In: Wray, C, Wray, A (eds.) *Salmonella in Domestic Animals*. CABI Publishing, New York, pp. 355-372
 21. Zee H, Veld JHJH (2000) Methods for the rapid detection of *Salmonella*. In: Wray, C, Wray, A (eds.) *Salmonella in domestic animals*. CABI Publishing, New York, pp. 373-391
 22. Clinical and Laboratory Standards Institute (2011) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S21. CLSI, Wayne.
 23. Clinical and Laboratory Standards Institute (2012) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Document M100-S22. CLSI, Wayne.
 24. World Health Organization (2010) Top 15 lists from a country. http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show. Accessed September 16 2011
 25. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM (2011) Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Foodborne Infectious Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne pathogens and disease* 8: 887-900.
 26. Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi AC, Dias AM, Almeida IA, Melo LC (2006) *Salmonella* serovars isolated from humans in Sao Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 48: 179-184.
 27. Santos LR, Nascimento VP, Oliveira SD, Rodrigues DP, Reis EMF, Seki LM, Ribeiro AR, Fernandes SA (2003) Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in southern Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 45: 1-4.
 28. Oliveira FA, Brandelli A, Tondo EC (2006) Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *New Microbiol* 29: 49-54.
 29. Murmann L, dos Santos MC, Longaray SM, Both JMC, Cardoso M (2008) Quantification and Molecular Characterization of *Salmonella* Isolated from Food Samples Involved in Salmonellosis Outbreaks in Rio Grande Do Sul, Brazil. *Braz J Microbiol* 39: 529-534.

30. Oliveira FA, Geimba MP, Pasqualotto AP, Brandelli A, Pasquali G, Silva WP, Tondo EC (2009) Clonal relationship among *Salmonella enterica* serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in southern Brazil. *Food Control* 20: 606-610.
31. Medeiros MAN, de Oliveira DCN, Rodrigues DD, de Freitas DRC (2011) Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publ* 30: 555-560.
32. Chu C, Wong DW, Wang MH, Lin HH, Chen YS, Tien N, Shih MC, Chen TH, Chiu CH (2009) Genotyping, Plasmid Analysis, and Antimicrobial Susceptibility of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans and Chickens in Central Taiwan. *J Formos Med Assoc* 108: 765-771.
33. Castro FAd, Santos VRd, Martins CHG, Fernandes SA, Zaia JE, Martinez R (2002) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* serotypes in patients from Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, between 1985 and 1999. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 6: 244-251.
34. Zhao S, White DG, Friedman SL, Glenn A, Blickenstaff K, Ayers SL, Abbott JW, Hall-Robinson E, McDermott PF (2008) Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolates from retail meats, including poultry, from 2002 to 2006. *Applied and environmental microbiology* 74: 6656-6662.
35. Koningstein M, Simonsen J, Helms M, Molbak K (2010) The interaction between prior antimicrobial drug exposure and resistance in human *Salmonella* infections. *J Antimicrob Chemoth* 65: 1819-1825.
36. Plachouras D, Kavatha D, Antoniadou A, Giannitsioti E, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamarellou H (2010) Dispensing of antibiotics without prescription in Greece, 2008: another link in the antibiotic resistance chain. *Eurosurveillance* 15: 12-15.
37. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (2009) Instrução Normativa 26/2009.
38. Pereira FSVT, Bucarechi F, Stephan C, Cordeiro R (2007) Self-medication in children and adolescents. *J Pediatr* 83:453-458.
39. Tourinho FSV, Bucarechi F, Stephan C, Cordeiro R (2008) Home medicine chests and their relationship with self-medication in children and adolescents. *J Pediatr* 84:416-422.
40. Fiol FSD, Lopes LC, Toledo MI, Barberato-Filho S (2010) Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Rev Soc Bras Med Trop* 43:68-72.
41. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK (2010) Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 156: 3216-3223.
42. Gaul SB, Wedel S, Erdman MM, Harris DL, Harris IT, Ferris KE, Hoffman L (2007) Use of pulsed-field gel electrophoresis of conserved XbaI fragments for identification of swine *Salmonella* serotypes. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 472-476.
43. Li X, Payne JB, Santos FB, Levine JF, Anderson KE, Sheldon BW (2007) *Salmonella* populations and prevalence in layer feces from commercial high-rise houses and characterization of the *Salmonella* isolates by serotyping, antibiotic resistance analysis, and pulsed field gel electrophoresis. *Poult Sci* 86: 591-597.
44. Thong KL, Goh YL, Radu S, Noorzaleha S, Yasin R, Koh YT, Lim VK, Rusul G, Puthuchery SD (2002) Genetic diversity of clinical and environmental strains of *Salmonella enterica* serotype Weltevreden isolated in Malaysia. *J Clin Microbiol* 40: 2498-2503.
45. Chenu JW, Cox JM, Pavic A (2012) Classification of *Salmonella enterica* serotypes from Australian poultry using repetitive sequence-based PCR. *J Appl Microbiol* 112: 185-196.