

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

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

**Fábio Campioni**

**Ribeirão Preto  
2013**

## RESUMO

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

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



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - Gênero *Salmonella*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Extraído de (GUIBOURDENCHE et al., 2010)

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

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

## 1.2 - Características do micro-organismo

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

*Salmonella* é oxidase negativo, catalase positivo, indol e Voges Proskauer (VP) negativos, vermelho de metila e citrato de Simmons positivos, produtor de H<sub>2</sub>S e uréia negativo (HENDRIKSEN, 2003; NATARO et al., 2007).

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

**Tabela 2** – Reações bioquímicas utilizadas na diferenciação das espécies e subespécies de *Salmonella*<sup>a</sup>

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

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

<sup>b</sup> 67% das linhagens testadas positivas

<sup>c</sup> 15% das linhagens testadas positivas

<sup>d</sup> 85% das linhagens testadas positivas

<sup>e</sup> 22% das linhagens testadas positivas

<sup>f</sup> 15% das linhagens testadas positivas

<sup>g</sup> 44% das linhagens testadas positivas

<sup>h</sup> 60% das linhagens testadas positivas

<sup>i</sup> 30% das linhagens testadas positivas

<sup>j</sup> Tartarato de sódio e potássio

Adaptado de (Nataro et al., 2007)

### 1.3 - *Salmonella enterica* subespécie *enterica*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

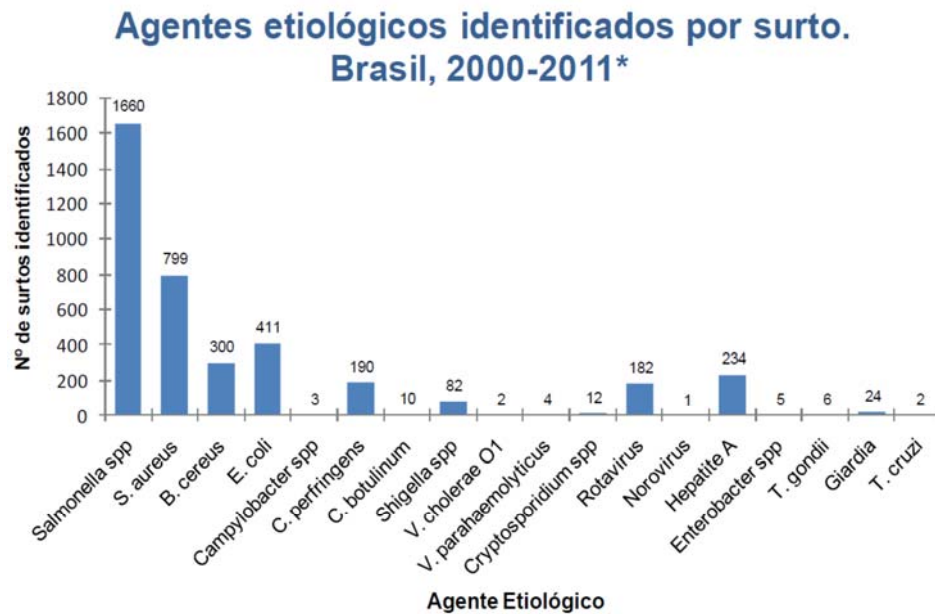
A data precisa do início da pandemia de *S. Enteritidis* e suas razões não são bem estabelecidas. Entretanto acredita-se que possa ter se iniciado a partir do intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa. Também não é claro o porquê de linhagens de determinados fagotipos predominarem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

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

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

\* Ano de isolamento

Adaptada de Taunay *et al.* (1996)



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

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

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

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

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

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

#### **1.4.2 – Patogênese e manifestações clínicas**

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4.3 – Genes de virulência**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4.4 – Resistência a antimicrobianos**

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4.5 – Métodos de tipagem de *Salmonella* Enteritidis**

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4.5.2 – Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)**

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4.5.3 – *Multilocus sequence typing* (MLST)**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

#### **1.4.5.5 – High-resolution melting analysis (HRMA)**

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

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

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

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

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

### **1.5 – Relevância do estudo**

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

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

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

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

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



**CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

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

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

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

## **REFERÊNCIAS**

---

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 26, n. 11, p. 2465-6, Nov 1988. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3069867> >.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

LI, J. et al. Recombinational basis of serovar diversity in *Salmonella enterica*. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 91, n. 7, p. 2552-6, Mar 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8146152> >.

LIEBANA, E. et al. Comparison of gyrA mutations, cyclohexane resistance, and the presence of class I integrons in *Salmonella enterica* from farm animals in England and Wales. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1481-6, Apr 2002. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11923377> >.

LIEBANA, E. et al. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 154-61, Jan 2001. ISSN 0095-1137. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136764> >.

LILIC, M.; QUEZADA, C. M.; STEBBINS, C. E. A conserved domain in type III secretion links the cytoplasmic domain of InvA to elements of the basal body. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 66, n. Pt 6, p. 709-13, Jun 2010. ISSN 1399-0047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20516623> >.

LINDSTEDT, B. A. Multiple-locus variable number tandem repeats analysis for genetic fingerprinting of pathogenic bacteria. **Electrophoresis**, v. 26, n. 13, p. 2567-82, Jun 2005. ISSN 0173-0835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937984> >.

LITRUP, E. et al. Association between phylogeny, virulence potential and serovars of *Salmonella enterica*. **Infection Genetics and Evolution**, v. 10, n. 7, p. 1132-9, Oct 2010. ISSN 1567-7257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20656064> >.

LU, Y. et al. Prevalence of antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from chicken in China. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 1, p. 45-53, Jan 2011. ISSN 1556-7125. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21083518> >.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525-9, Jul 1992. ISSN 0021-9193. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1624445> >.

MAGALHÃES, V. et al. Pulsed field gel eletrophoresis use in bacteriology - a technical review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAIDEN, M. C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140-5, Mar 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9501229> >.

- MAJOWICZ, S. E. et al. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Disease**, v. 50, n. 6, p. 882-9, Mar 2010. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20158401> >.
- MALORNY, B.; JUNKER, E.; HELMUTH, R. Multi-locus variable-number tandem repeat analysis for outbreak studies of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 84, 2008. ISSN 1471-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18513386> >.
- MARCUS, S. L. et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 2, p. 145-56, Feb 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10742687> >.
- MARTINS, C. et al. Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis strains reveals the spread of a single genotype in the Brazilian city of Ribeirão Preto. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**, v. 42, p. 19-23, 2006.
- MATSUOKA, D. M. et al. A nosocomial outbreak of *Salmonella* enteritidis associated with lyophilized enteral nutrition. **Journal of Hospital Infection**, v. 58, n. 2, p. 122-7, Oct 2004. ISSN 0195-6701. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15474183> >.
- MEDEIROS, M. A. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 30, n. 6, p. 555-60, Dec 2011. ISSN 1680-5348. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358402> >.
- MILLEMANN, Y. et al. Comparison of random amplified polymorphic DNA analysis and enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR for epidemiological studies of *Salmonella*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 14, n. 2-3, p. 129-34, Jun 1996. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8809548> >.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. (<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=211608>). Acessado em 8 de agosto de 2013.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Análise epidemiológica de surtos. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos\\_dta\\_15.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf). 2011>.
- MISHU, B. et al. Outbreaks of *Salmonella* enteritidis infections in the United States, 1985-1991. **Journal of Infectious Disease**, v. 169, n. 3, p. 547-52, Mar 1994. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8158026> >.
- MOTA, C. C. S. et al. Toxi-infecção alimentar por *Salmonella enteritidis*. Relato de um surto ocorrido em Curitiba-PR, Brasil/julho de 1981. **Higiene Alimentar**, v. 2, p. 123-131, 1983.
- MØLBAK, K. et al. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104. **New England Journal of**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

URWIN, R.; MAIDEN, M. C. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 479-87, Oct 2003. ISSN 0966-842X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14557031> >.

UZZAU, S. et al. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. **Epidemiol Infect**, v. 125, n. 2, p. 229-55, Oct 2000. ISSN 0950-2688. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11117946> >.

VAN BELKUM, A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 22-7, Feb 2007. ISSN 0928-8244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17266711> >.

VAN BELKUM, A. et al. Variable number of tandem repeats in clinical strains of *Haemophilus influenzae*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 12, p. 5017-27, Dec 1997. ISSN 0019-9567. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393791> >.

VAZ, C. S. et al. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**, v. 89, n. 7, p. 1530-6, Jul 2010. ISSN 0032-5791. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20548083> >.

VELGE, P. et al. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. **Microbiology open**, v. 1, n. 3, p. 243-58, Sep 2012. ISSN 2045-8827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23170225> >.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J. R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823-31, Dec 1991. ISSN 0305-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1762913> >.

WALLIS, T. S.; GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 997-1005, Jun 2000. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10844685> >.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 6, p. 1156-68, Jun 2006. ISSN 0737-4038. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16533821> >.

WOLFSON, J. S.; HOOPER, D. C. Fluoroquinolone antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, n. 4, p. 378-424, Oct 1989. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680058> >.

WOZNIAK, C. E.; CHEVANCE, F. F.; HUGHES, K. T. Multiple promoters contribute to swarming and the coordination of transcription with flagellar assembly in *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 18, p. 4752-62, Sep 2010. ISSN 1098-5530. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20639318> >.

---

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

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

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