ESTUDO SOBRE CEPAS DE SALMONELLA ENTERICA SOROVAR TYPHIMURIUM RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS ISOLADAS DE DIFERENTES FONTES DA CADEIA ALIMENTAR NO BRASIL.

Luciane Martins Medeiros

Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras:
Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues
Dra. Verônica Viana Vieira

Rio de Janeiro
2006

Estudo sobre cepas de Salmonella enterica sorovar Typhimurium resistentes a antimicrobianos isoladas de diferentes fontes da cadeia alimentar no Brasil

.

Luciane Martins Medeiros

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovado:

Prof._____ Doutor

Prof._____ Doutor

Prof._____ Doutor

Orientadoras:_____

_____

Rio de Janeiro

2006

Ao meu querido filhote João
Guilherme, um ciclo que se inicia;

À inesquecível amiga Marília Miguez
(*in memoriam*), um ciclo que se encerra;

À minha alma gêmea Miguel Teixeira;

Aos meus pais, Pedro e Linda, meus
melhores amigos;

Ao meu Senhor, que me permitiu
conhecê-los

"Aquele que tem um porquê para viver
pode enfrentar todos os comos"

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste trabalho, por várias vezes senti desânimo, cansaço, solidão, tristeza e desespero. Tive momentos difíceis, tanto pessoais quanto profissionais, mas em todos eles pude contar com o apoio e a dedicação de amigos. Cada um ajudava como podia: um abraço, um cafezinho, uma orientação, um “bom dia”, uma ajuda com o João Guilherme, uma “mãozinha” no PFGE, uma correção, ... todos me ajudaram. A presente obra é fruto de um trabalho conjunto, muitas vezes silencioso, discreto, indireto. É um exemplo de solidariedade, companheirismo, amor e esperança, onde as diversas contribuições permitiram a realização e conclusão desta pesquisa. A todos vocês, meus amigos, os meus agradecimentos:

Inicialmente, a Deus, que me conduziu e não permitiu que nada me faltasse em todos os meus dias;

Participar de um programa de mestrado em uma instituição tão conceituada foi motivo de orgulho. Aproveito o momento para agradecer à Presidência da Fundação Oswaldo Cruz, na pessoa do Dr. Paulo Marchiori Buss; aos Diretores do INCQS e do IOC, representados pelo Dr. André Gemal e Dra. Tânia C. de Araújo-Jorge, respectivamente; à Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Dra. Maria Helena Simões; à chefe de Departamento de Bacteriologia do IOC, Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues; à chefe do Laboratório de Enterobactérias, Dra. Marise Dutra Asensi; e à CAPES, pela bolsa cedida durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao INCQS como um todo; cada servidor, bolsista, cooperado...mas em especial ao Departamento de Microbiologia (anteriormente representado pela Dra. Marise e agora pela Dra. Célia) e seus setores de Alimentos, Bacteriologia, Biologia Molecular, Esterilização, Meios de Cultura e Cepas de Referência. Também ao Departamento de Química (representado pela Dra. Kátia), do qual me considero “membro honorário”;

Por falar em INCQS, agradeço aos amigos de todas as horas: Carla, Márcia, Cláudia, Filipe, Manuela, Bernardete, Valéria, Joselene, “Mariinha”, Sinéa, Maria Regina, Marcos, Michele, Marília, Carmen, Vanda, Ilka, Cristina, Suely, Rosana,

Leonardo, Marcio, Kadu, Isabella, Renatinha, Érica, Carlos e o pessoal da informática. Vocês fazem parte de mim, da minha história, e eu sou eternamente grata pelo carinho e pela torcida de vocês!

Vou agradecer também aos meus novos amigos do IOC: Eliane, Grace, Seu Evaldo, Christiane Pereira, Simone, Wanderson, Edmar, Renata, Seu Junair, Seu Elso, Márcia, Gisele, Graziele, Sheila, Ana Luzia, Marise, Tadeu, Joseli, Maiara, Seu Jorge, Marinalva, Rosane, Daniel, Michele, Marcos, Liliane, Ednéia e todos os de outros laboratórios. Vocês foram responsáveis por incontáveis momentos de alegria e descontração durante este período. Estou aguardando nossa próxima ida ao rodízio de pizza;

Aos meus amigos da turma de Pós-Graduação – Luciana, Marília (*in memoriam*), Gina, Márcia(s), Aline, Marisa, Sônia, Thaiz, Cyllene, Cristina(s), Marcos, Anderson, Sheila e Elaine – cujo estresse dos seminários e provas era diluído nos churrascos organizados pelo "superman" Jefferson;

Aos amigos "de fora" da FIOCRUZ, mas que acompanharam de perto o desenrolar desta pesquisa: Maria Eduarda, Andréia, Binho, Simone, Evandro, Paula, Elisa, Denise, Luizão, Christine, Vilquer, Nane, Alan, Viviane, Virgílio, Andreinha, Roberta, Lara e Bruno. Um grande abraço também a todos os funcionários da GRANTUR, por se preocuparem comigo.

Agradeço de coração a cada uma das pessoas citadas. Entretanto, tem um grupo de amigos que foi fundamental para a realização deste trabalho. Ao longo destes dois anos e meio, pude observar que a verdadeira amizade não mede esforços, e muitos destes "anjos" estiveram trabalhando junto a mim. De fato, são pessoas iluminadas, que exercem a caridade no seu dia-a-dia de uma maneira espontânea e discreta, e que transformam o mundo com simplicidade e sabedoria. Eu quero dizer MUITO OBRIGADA:

Aos amigos Érica Louro, Cristhiane Moura e André das Mercês, do LABENT/IOC. Com vocês, esse trabalho se tornou possível e prazeroso. Obrigada por

terem empregado o tempo de vocês no meu auxílio. De todas as conquistas que tive associadas à minha pesquisa, a amizade de vocês foi a mais preciosa;

À Dra. Verônica e Dra. Dália, minhas orientadoras, pelo carinho e dedicação com que me acolheram e guiaram durante este período, mesmo com todos os problemas que enfrentei. Sei que eu “aluguei” vocês com um milhão de trapalhadas, mas mesmo assim encontrei sempre um sorriso paciente em seus lábios. Agradeço não só a ajuda técnica, mas principalmente a humana;

À Dra. Paola Cardarelli, Dra. Norma Lázaro, Dra. Ângela Almeida, Dra. Maria Helena Simões, Dra. Regine Helena Fernandes, membros da minha banca e revisoras de meu trabalho. Obrigada pelo esforço que todas fizeram para que eu conseguisse defender o meu trabalho no tempo adequado. Eu realmente não encontro palavras para expressar a minha gratidão, mas espero que saibam que guardarei com carinho todas as palavras e atitudes amigas que vocês me ofertaram;

Aos meus irmãos Lucia e José Luiz; meus pais, Pedro e Linda; meus tios, Florêncio e Glória; minha família do Sul; meus primos, Talita, Cláudia, Nádia e Henrique; minha cunhada Ana Sofia e meus sogros Manuel e Mª Virgínia, por todo apoio pessoal e financeiro oferecido durante toda a minha vida. Tenho sorte de ter nascido numa família feliz e mais sorte ainda de ter sido acolhida por outra igualmente especial. Os laços que nos uniram podem ser até os de sangue, porém são os de respeito que nos mantêm unidos. Obrigada por cuidarem de mim e do JG;

Aos meus amores Miguel e João Guilherme. Miguel, meu companheiro, esse trabalho também é seu. Muito obrigada por abraçar o meu sonho, por me ajudar a construir cada tijolinho do castelo de felicidade que tem sido a nossa convivência. O seu amor e amizade me permitiram alçar vôo e se hoje eu sou melhor, tenha certeza que é por você ter abençoado a minha vida. João Guigui, meu pinguinho, você mostrou a mim e a seu pai o mais pleno sentido do amor, da esperança e da fé. Papai do Céu nos abençoou quando nos confiou a guarda de um ser tão especial como você. Obrigada, em particular, pelo meu amadurecimento como ser humano. Amo vocês.

E a todos que eu não citei, mas que de alguma forma participaram desta “cruzada”, o meu sincero agradecimento.

Medeiros, L.M. **Estudo sobre cepas de S<u>almonella</u> <u>enterica</u> sorovar Typhimurium resistentes a antimicrobianos isoladas de diferentes fontes da cadeia alimentar no Brasil**. Rio de Janeiro, 2006 [Dissertação em Vigilância Sanitária – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde].

RESUMO

O presente estudo teve como proposta o monitoramento da resistência a drogas antimicrobianas entre 390 isolados de *Salmonella* Typhimurium de diversas fontes (animal, ambiental, alimentar, humana e de matéria-prima/rações) de contaminação da cadeia alimentar no Brasil, no período de 1999 a 2003. Todas as regiões geográficas brasileiras foram contempladas. Para o desenvolvimento deste trabalho, além da avaliação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, foram utilizadas ferramentas epidemiológicas mais comumente usadas para este sorovar (lisotipia, perfil plasmidial e PFGE). Das 390 cepas avaliadas neste estudo, 346 apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, sendo Tetraciclina (85,84%), Nitrofurantoína (67,63%), Cloranfenicol (30,93%) e Ácido Nalidíxico (26,01%) os mais prevalentes. Três cepas apresentaram resistência à ceftriaxona e uma ao imipenem e todas as cepas foram susceptíveis à ciprofloxacina. Foram obtidos 72 perfis de susceptibilidade. O fagotipo prevalente em todos os anos, fontes e regiões geográficas foi o DT193. A multirresistência esteve associada em 44,13% dos isolados deste fagotipo. Também foi caracterizado o fagotipo DT104 multirresistente. Este foi o primeiro relato deste fagotipo no Brasil. Foram caracterizados, no total, 14 fagotipos. Noventa e nove isolados foram submetidos à análise do perfil plasmidial, obtendo-se 28 perfis distintos. Treze isolados humanos foram submetidos à técnica de PFGE com a enzima *Xba*I. Foram identificados sete perfis de macrorrestrição, sendo encontrada clonalidade entre os isolados testados.

Medeiros, L.M**. A study on strains of Salmonella enterica serovar Typhimurium resistant to antimicrobian drugs isolates from different sources in the food chain in Brazil**. Rio de Janeiro, 2006 [Dissertation in Sanitary Surveillance – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde].

ABSTRACT

The present study aimed at monitoring the resistance to antimicrobian drugs in 390 isolates of *Salmonella* Typhimurium from different sources (animal, environmental, alimentary, human and from raw material/feed animal of contamination of the food chain in Brazil, from 1999 to 2003, including all geographic regions of this country. For such, as well as an evaluation of the profile of susceptibility to antimicrobian drugs, the epidemiological tools most commonly employed for this serovar (phage typing, plasmid profile and PFGE) were used. From the 390 isolates evaluated in the present study, 346 showed resistance to at least one antimicrobian drug, the most prevalent of which being Tetracycline (85,84%), nitrofurantoin (67,63%), chloramphenicol (30,93%) and naladixic acid (26,01%). Three isolates showed resistance to ceftriaxone and one to imipenem. All strains were susceptible to ciprofloxacin. A total of 72 profiles of susceptibility were obtained. The prevalent phage type in every year, source and geographic regions was the DT193. A multiresistance was found in 44,13% of the isolates of this phage type. The multiresistant phage type DT104 was also characterized. This was the first report of this phage type in Brazil. A total of 14 phage types were characterized. Ninety-nine isolates were subjected to the analysis of the plasmidial profile, from which 28 distinct profiles were obtained. Thirteen human isolates were subjected to the PFGE technique with the enzyme *Xba*I. Seven macrorestriction profiles were identified, with clonality having been found among the tested isolates.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Análise plasmidial de *S*. Typhimurium oriundas de diferentes fontes e regiões do país (cepas 1B a 18B)----------67

Figura 2 – Análise plasmidial de *S*. Typhimurium oriundas de diferentes fontes e regiões do país (cepas 1C a 18C)----------68

Figura 3 – Perfis de restrição do DNA cromossômico observados nas seis cepas de *S*. Typhimurium, gerados na eletroforese em campo pulsado, após digestão com as endonucleases *Spe*I e *Xba*I (teste das enzimas)----------69

Figura 4 – Perfis de restrição do DNA cromossômico observados em três cepas distintas de *S*. Typhimurium, gerados na eletroforese em campo pulsado, após digestão com a endonuclease *Xba*I (teste das variações de protocolo)----------70

Figura 5 – Perfis de restrição do DNA cromossômico observados nas 13 cepas de origem humana de *S*. Typhimurium, gerados na eletroforese em campo pulsado, após digestão com a endonuclease *Xba*I ----------71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Exemplo do esquema de classificação antigênica de *Salmonella*----------13

Quadro 2 – Divisão dos antimicrobianos segundo seus mecanismos de ação----------20

Quadro 3 – Distribuição dos isolados utilizados no presente estudo segundo o ano, região geográfica e fonte de isolamento----------30

LISTA DE SIGLAS

CDC – Centers For Disease Control and Prevention

NCCLS -

CLSI

FOODNET – Foodborne disease active surveillance network.

PULSENET – National network of public health and food regulatory agency laboratories for *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, or *Campylobacter*.

RFLP

PFGE

OMS

WHO

DNA

RAPD

ACSSuT

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos perfis de resistência aos antimicrobianos em *S.* Typhimurium de acordo com ano de isolamento----------54

Tabela 2 – Freqüência e distribuição dos marcos de resistência em *S*. Typhimurium de acordo com a fonte de isolamento----------56

Tabela 3 – Freqüência e distribuição dos marcos de resistência em *S*. Typhimurium de acordo com o ano de isolamento ----------56

Tabela 4 – Distribuição númerica da resistência das cepas nas diferentes classes de antimicrobianos entre os isolados de *S*. Typhimurium de acordo com o ano e fonte de isolamento----------57

Tabela 5 – Correlação da fonte de isolamento com o fagotipo de *S*. Typhimurium-----57

Tabela 6 – Distribuição e freqüência dos fagotipos de *S*. Typhimurium nas diferentes regiões geográficas do país.----------58

Tabela 7 – Perfis de resistência entre isolados de *S*. Typhimurium DT193 de acordo com a fonte e o ano de isolamento----------59

Tabela 8 – Distribuição e freqüência dos marcos de resistência em *S*. Typhimurium de acordo com o fagotipo..----------62

Tabela 9 – Perfis plasmidiais obtidos, caracterizado pelos plasmídios encontrados (em kb) e distribuídos segundo a fonte de isolamento.----------63

Tabela 10 – Distribuição e freqüência dos perfis plasmidiais segundo o fagotipo------64

Tabela 11 – Distribuição e freqüência dos perfis plasmidiais de acordo com os marcos de resistência----------65

Tabela 12 – Características das cepas de *S*. Typhimurium de origem humana avaliadas através de PFGE.----------66

SUMÁRIO

RESUMO viii
ABSTRACT ix
1. INTRODUÇÃO----------1

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA----------3
2.1. Vigilância Sanitária de alimentos 3
2.1.1 Panorama mundial 3
2.1.1.1. Programa de monitoramento de patógenos 5
2.1.2. Vigilância Sanitária no Brasil 6
2.1.2.1. Programas brasileiros 10
2.1.2.1.1. Programa Nacional de Sanidade Avícola 10
2.1.2.1.2. Programa Nacional de Prevalência e resistência de *Salmonella* em frangos 11
2.1.2.1.3. Programa Nacional de Monitoramento da Resistência a Antimicrobianos em Enteropatógenos 11
2.1.3. Salmonela em frangos e outros alimentos 11
2.2. O gênero *Salmonella* 12
2.2.1. *Salmonella* Typhimurium 16
2.3. Resistencia a antimicrobianos 20
2.4. Fagotipagem 24
2.5. Métodos moleculares 24
2.5.1. PFGE e Análise Plasmidial 27
3. OBJETIVOS----------28
3.1. Objetivo geral 28
3.2. Objetivos específicos 28
4. MATERIAL E MÉTODOS----------29
4.1. Seleção e tratamento dos isolados 29
4.1.1 Amostragem 29
4.1.2. Caracterização bioquímica 31
4.1.3. Caracterização antigência 31
4.2. Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos 31
4.3. Análise Plasmidial 33
4.4. Fagotipagem 34
4.5. Eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE) 35
4.5.1. Preparação dos blocos de agarose contendo o DNA bacteriano 35
4.5.2. Extração e purificação do DNA cromossômico 37
4.5.3. Digestão do DNA cromossômico 38
4.5.3.1. Seleção da endonuclease de restrição 38
4.5.3.2. Etapas da digestão 38
4.5.4. Eletroforese em campo pulsado 38

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO----------40
6. CONCLUSÕES----------72
7. APÊNDICE----------73
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS----------79

1. INTRODUÇÃO

Em diversos países, infecções zoonóticas bacterianas de origem alimentar são a causa mais comum de patologias intestinais humanas. Neste contexto, o gênero *Salmonella* está entre os patógenos mais incidentes, destacando-se o sorovar Typhimurium pelo aumento de sua ocorrência no Brasil, de acordo com relatórios de Rodrigues (2000-2005) apresentados à Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública/CENEPI/MS.

Este sorovar em particular apresenta sua relevância na atualidade dada às características epidêmicas, apontadas em diferentes países da Europa, Estados Unidos e em alguns países da África e da Ásia. Um fagotipo em especial de *S.* Typhimurium, o DT 104, vem recebendo destaque pelo aumento da prevalência de casos e pelo dinâmico perfil de resistência a antimicrobianos. Por ser ubíquo, capaz de colonizar uma grande variedade de hospedeiros e nichos ambientais, sua disseminação entre animais de produção (que atuam como reservatórios) tem representado um grave risco de contaminação da cadeia alimentar. Segundo TEUBER (1999), o problema de resistência na medicina humana não será resolvido se houver uma afluência constante de genes de resistência para o homem via cadeia alimentar e esta correlação é claramente apontada em alimentos de origem animal e rações em nosso meio por HOFER *et al* (1998).

Em sistemas de criação intensiva de animais para consumo, as salmoneloses ocasionam um aumento no custo financeiro, devido ao aumento na morbidade e mortalidade animal, assim como redução na produção de leite e ovos. Isso resulta no aumento dos gastos com programas de controle e redução do valor dos produtos que estão contaminados.

Para o homem, a disseminação de clones multirresistentes representa relevante aspecto em saúde pública, com dificuldade de tratamento especialmente em crianças, idosos e imunocomprometidos, além das perdas econômicas ocasionadas pelos gastos hospitalares e absenteísmo. A resistência a antimicrobianos em salmonelas transmitidas entre homens e animais é indesejável. Todavia, é praticamente inevitável, devido ao uso destas drogas em animais de produção. Dessa forma, o monitoramento das cepas emergentes que apresentem resistência múltipla deve ser realizado, para que sejam planejadas ações preventivas e reguladoras junto às principais fontes de

disseminação. Dados de epidemiologia e rastreabilidade de cepas brasileiras ainda são precários, necessitando estudos contínuos e profundos que preencham as diversas lacunas existentes. Para isso, a Vigilância Sanitária desempenha papel de extrema importância pois, através de análises fiscais e de monitoramento, gera um volume significante de informações sobre o comportamento de cepas em nosso território.

A caracterização antigênica e o monitoramento de resistência são ferramentas importantes na epidemiologia de *Salmonella* sp. Entretanto, é necessário o uso de métodos epidemiológicos mais efetivos – como fagotipagem – e principalmente moleculares, como o PFGE, para surpreender a introdução de clones de natureza epidêmica em nosso meio.

Por representar um perigo iminente entre as salmonelas, *S.* Typhimurium foi o sorovar escolhido para a realização do presente trabalho e, visando responder se existe clonalidade nas cepas de *S.* Typhimurium circulantes no Brasil e quais as suas características, foram escolhidas as técnicas de fagotipagem, teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, análise plasmidial e PFGE. Estas ferramentas também permitiriam a obtenção de informações sobre quais os fagotipos prevalentes e se houve a introdução do fagotipo DT104 no nosso território, além do rastreamento deste sorovar em diversas fontes. Por fim, foi realizado um pequeno contraponto com as RDC n° 12/01 e 13/01 e a Constituição Federal, sob a égide da Vigilância Sanitária, com o intuito de lançar um debate sobre o direito à saúde.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Vigilância Sanitária de Alimentos

2.1.1. Panorama Mundial

Apesar dos extensivos ensinamentos sobre higiene dos alimentos para a prevenção de doenças de origem alimentar (DTA), a incidência de surtos e casos esporádicos aumenta progressivamente. Na Inglaterra, por exemplo, estima-se que uma a cada cinco pessoas desenvolve gastrenterite anualmente. Esse índice, nos Estados Unidos da América (EUA), é de 28% ao ano (FORSYTHE 2002).

Avanços obtidos em diferentes áreas ao longo das últimas décadas vêm permitindo a longevidade de diversos grupos populacionais, como indivíduos portadores de doenças crônico-degenetativas, imunodeprimidos, idosos e transplantados. Nestes, entretanto, a ocorrência de infecções oportunistas tem representado um problema importante de Saúde Pública, principalmente as de origem zoonótica. De acordo com um parecer da OMS, apresentado na Primeira Conferência Internacional de Zoonoses Emergentes em Jerusalém no ano de 1996, ações de prevenção e de controle de zoonoses deverão constar como principal preocupação em países emergentes, sendo a vigilância destas doenças necessária junto a essas ações (VIANNA, 2003).

A veiculação de zoonoses também é alvo do Escritório Internacional de Epizootias (OIE), que elaborou o “Código Sanitário para Animais Terrestres” e o “Código Sanitário para Animais Aquáticos”, visando evitar o ingresso de doenças e patógenos infecciosos veiculados por produtos de origem animal nos países. Estes códigos criaram barreiras sanitárias internacionais e, com base neles, a OIE formulou duas listas de doenças tidas como “prioritárias” para o comércio internacional (Lista A e Lista B), disponíveis no “site” da OIE (http://www.oie.int).

Em relação à Saúde Pública, as infecções bacterianas de caráter zoonótico veiculadas por alimentos constituem a principal causa de patologia intestinal humana. Como o ciclo de transmissão da salmonela envolve praticamente todos os vertebrados e sua veiculação está associada à ingestão de alimentos, a salmonelose é considerada a zoonose mais difundida do mundo, sendo as aves consideradas o maior

reservatório deste patógeno na natureza (ACHA & SZYFRES, 1986; THORNS 2000; MARCUS *et al*, 2000).

Os gastos com salmoneloses na Inglaterra e no País de Gales foram estimados em 40 a 50 milhões de libras em 1991, com 23 mil casos. Na Suécia, o cálculo foi de 28 milhões de libras e, nos EUA, de 3,9 bilhões de dólares (SOCKET, 1991; KOHL & FARLEY, 2000; FORSYTHE, 2002).

Na Lista B da OIE ("Doenças transmissíveis que se consideram importantes do ponto de vista sócio-econômico e/ou sanitário e cujas repercussões no comércio internacional de animais são consideráveis"), as salmoneloses constam como importantes enfermidades em ovinos/caprinos (*S.* abortusovis) e em aves (pulorose e tifo aviário) (http://www.oie.int).

MACHADO & BERNARDO (1990), em Portugal, evidenciaram o risco de contaminação humana por carcaças de frangos positivas para *Salmonella* sp (57% do total analisado).HERNANDEZ et al (2005), na Espanha, obtiveram um total de 16,% de isolamento deste patógeno em carcaças e cortes congelados de aves importados. Neste último trabalho, os países fornecedores que apresentavam maiores porcentagens de amostras contaminadas foram França e Brasil. No nosso país, esta contaminação também tem sido apontada (COSTA, 1998; SEKI, 2000; SILVA, 2004). Os alimentos representam uma fonte de veiculação de doenças, sendo sugerida em vários trabalhos a veiculação de patógenos para o homem (CALLOW, 1959; THRELFALL, 2000; HOHMANN, 2001).

Portanto, a produção, comercialização e consumo de alimentos tornaram-se atividades passíveis de oferecer risco à saúde. A Organização Mundial da Saúde (WHO) e a FAO (Órgão das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura), através da elaboração do "Codex Alimentarius", apresentaram um padrão global para interpretar a aceitabilidade do risco associado a alimentos. Neste documento, são mencionados produtos alimentares (e matérias-primas) que estão relacionados à presença de patógenos ao longo da cadeia alimentar (FORSYTHE 2002).

Esta abordagem apresenta cunho científico, através da combinação de dados quantitativos e qualitativos (de natureza epidemiológica e patogênica)

relacionados com a produção e manuseio de alimentos. Os riscos relacionados a esses devem ser analisados para o estabelecimento da dose-resposta do consumidor “alvo”, da gravidade da doença, da prevalência no produto e das falhas no processamento. Para isso, devemos associar um patógeno específico à ocorrência de surto de transmissão alimentar (COMISSÃO DO CODEX ALIMENTARIUS, 1997a, 1997b, 1999a e 1999b).

Dessa forma, a análise do risco compreende o conhecimento sobre prevalência e resistência de determinado patógeno na cadeia, que só podem ser observadas (e definidas) quando há um monitoramento contínuo. Este último tem sido efetuado com a utilização de métodos clássicos e moleculares, que atuam como marcadores epidemiológicos e permitem o rastreamento do patógeno. Os marcadores apresentam papel fundamental na caracterização do microrganismo e permitem a identificação de fontes de disseminação para o homem de sorovares que mostram incidência elevada ou que oferecem risco de serem introduzidos no nosso meio.

2.1.1.1. Programa de monitoramento de patógenos

Como microrganismos (MO) patogênicos estão presentes em animais, solo, água e vegetais, é impossível que produtos sem cocção prévia ou matéria-prima empregadas no preparo de alimentos sejam isentos desses. Além disso, falhas no sistema de processamento de produtos de origem animal podem ocasionar a contaminação de carcaças e seus subprodutos. Dessa forma, para evitar DTAs, os patógenos de ingredientes devem ser identificados e controlados. Para isso, são necessários programas de controle, entre os quais a vigilância é parte essencial na segurança alimentar. Cita-se, como exemplo, o sistema de controle de salmonela na Suécia. Este custa ao país cerca de 8 milhões de dólares/ano, sendo uma quantia pequena quando comparada com o gasto com tratamento médico, estimado em 28 milhões dólares/ano, enquanto o programa de controle custa menos de 11 centavos de dólar por quilo de galinha (ALTEKRUSE *et al*, 1993; CRUMP *et al*, 2002)

Outros exemplos são os programas americanos (como o FoodNet e o PulseNet) e europeus (como o EnterNet). O PulseNet, em especial, é uma rede de detecção internacional de *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp, baseada na análise metabólica e molecular, sendo esta última através do PFGE. Os perfis de bandas obtidos

de cepas isoladas de fonte humana e alimentar estão disponíveis em uma rede de computadores e visam surpreender a introdução em uma área incólume de cepas exóticas ou de características epidêmicas. Dessa forma, os surtos podem ser rapidamente investigados e suas fontes de disseminação reconhecidas (CDC_A, 2004; CDC_B, 2004).

Preocupados com o risco que patógenos multirresistentes causadores de DTAs oferecem à Saúde Pública, muitos países/entidades estão realizando também programas de monitoramento da resistência a antibióticos e estabelecendo diretrizes para o controle do aumento: WHO (Divisão de Vigilância e Controle de Doenças Notificadas Emergentes – EMC), EUA (Aliança para a Utilização Prudente de Antibiótico – APUA), Dinamarca (Programa Dinamarquês Integrado de Pesquisa e Monitoramento de Resistência Antimicrobiana – DANMAP), Japão (Programa de Monitoramento de Resistência Antimicrobiana Veterinária Japonesa), Sistema Europeu de Vigilância à Resistência Antimicrobiana (EARSS), entre outros.

2.1.2. Vigilância Sanitária no Brasil

A Constituição Federal de 1988 representou um grande marco na Saúde Pública brasileira, ao instituir a saúde como um direito social (bem jurídico, inalienável ao indivíduo e à sociedade), conforme o artigo 6º desta Constituição. O artigo 196 afirma que “a saúde é direito de todos e dever do Estado, garantido mediante políticas sociais e econômicas que visem à redução do risco de doença e de outros agravos e ao acesso universal e igualitário às ações e serviços para sua promoção, proteção e recuperação”. Assim, o acesso à saúde se democratizou, pois passou de concessão (somente contribuintes usufruíam dos serviços públicos de saúde) a direito constitucional, onde todo cidadão, empregado ou não, tem direito à saúde (BARRETO, 2002).

As resoluções da 8ª Conferência Nacional de Saúde serviram de parâmetros para a redação dos artigos relacionados a esta e orientaram a criação do Sistema Único de Saúde (SUS). Esse novo sistema apresentava como princípios doutrinários a universalidade do acesso, a equidade no atendimento e a integralidade dos serviços e ações de saúde (BRASIL, 2000).

O conceito de saúde agora é calcado na promoção e proteção e não mais no estado de “ausência de doença”, sendo entendido como um conjunto de fatores que confluem para a qualidade de vida, incluindo alimentação, trabalho, educação, saneamento, vigilância sanitária e farmacológica, entre outros (BRASIL, 2000; VIANNA, 2003).

O artigo 200 da Constituição Federal trata das competências do SUS e, entre elas, observamos a execução de atividades de vigilância sanitária e epidemiológica e a fiscalização e inspeção de alimentos. Com base neste artigo, fica evidenciado o aspecto legal da competência do SUS – conseqüentemente do Ministério da Saúde – por estas atividades (DIAS, 1995).

As Leis 8080 e 8142, ambas de 1990, formam a Lei Orgânica da Saúde (LOS). Elas regulamentam o SUS, dispondo sobre organização e financiamento deste sistema. Com a Criação de Conselhos de Saúde nas três esferas de governo, a LOS traz a Sociedade Civil para participar da política de saúde, sendo esta mais uma conquista democrática do SUS (BARRETO, 2002).

A Vigilância Sanitária é um dos “braços” do SUS e tem suas ações definidas pelos artigos 15 a 18 da Lei 8080/90. O artigo sexto da mesma lei define a vigilância sanitária como “conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde...”. É considerada a forma mais complexa da Saúde Pública, por contemplar toda as atividades médico-sanitárias, desde a promoção até a recuperação da saúde. A atuação da Vigilância Sanitária, em geral, consiste em zelar pela saúde e melhorar a qualidade de vida da população como um todo. Ela é um dos importantes instrumentos de Saúde Pública e cria mecanismos efetivos de proteção à saúde, sendo subsidiada por conhecimentos epidemiológicos e outras áreas afins (BRASIL, 1990; ROZENFELD, 2000; VIANNA, 2001).

A Lei 9782/99 instituiu o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária e criou a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Como outras agências reguladoras, a ANVISA é uma forma mais técnica e menos política de administração pública, sendo uma autarquia sob regime especial. Possui autonomia jurídica

(competência regulatória) e poderes de intervenção do domínio econômico (poder de polícia) (CARVALHO, 2004).

Assim sendo, a ANVISA assumiu a função, entre outras, de elaboração de normas e regulamentos relacionados à vigilância sanitária. Em 2001, aprovou o "Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos" (RDC n° 12 de 02/01/2001), revogando a Portaria SVS/MS 451/97. A RDC 12/01 representou um grande avanço na legislação brasileira de alimentos por abordar planos de amostragem e critérios microbiológicos, já preconizados internacionalmente ($BRASIL_A$, 2001).

Segundo a Comissão do *Codex Alimentarius*, os critérios microbiológicos devem ser estabelecidos com base nos princípios dos planos de amostragem, na análise de risco do alimento em questão e em análises e métodos científicos. Eles são usados para determinar a consistência do processamento tecnológico com os Princípios Gerais de Higiene de Alimentos e para examinar alimentos de origem desconhecida ou incerta. Um critério microbiológico irá determinar a aceitabilidade de um produto alimentar com base na presença/ausência ou no número de microrganismos presentes (COMISSÃO DO CODEX ALIMENTARIUS, 1997a).

A RDC 12/01, entretanto, também apresentou algumas alterações em relação às análises exigidas para carnes e produtos cárneos (item 5 desta legislação), mais especificamente para carnes resfriadas, congeladas e "in natura" de aves (cortes e carcaças inteiras ou fracionadas), miúdos de aves e carnes cruas preparadas de aves (refrigeradas ou congeladas, temperadas), que correspondem aos subitens 5.b, 5.c e 5.d, respectivamente. De acordo com o novo Regulamento, a pesquisa de *Salmonella* sp deixou de ser realizada nestes produtos alimentícios contidos nos subitens supra mencionados. Em contraponto, foi publicada juntamente a RDC n° 13 de 02/01/2001, que aprova o "Regulamento Técnico para Instruções de Uso, Preparo e Conservação na Rotulagem de Carne de Aves e seus Miúdos Crus, Resfriados ou Congelados". Esta resolução estabelece a obrigatoriedade de instruções de uso nos rótulos dos produtos em questão (carne de aves e seus miúdos, congelados ou resfriados), alertando o consumidor para possíveis riscos associados à contaminação por *Salmonella* sp ($BRASIL_A$, 2001; $BRASIL_B$, 2001).

Aqui no Brasil, diversas zoonoses têm diretrizes de prevenção determinadas pelos órgãos públicos de saúde e o Estado é responsável pela execução de tais, com base na Constituição Federal de 1988. VIANNA (2003) ainda ressalta que é necessário o monitoramento de comportamento das espécies e de alterações ambientais, assim como maior investimento nas estruturas de vigilâncias sanitária e epidemiológica, para que as ações de controle de zoonoses sejam sólidas.

A Lei Federal n° 6437/77, que dispõe sobre infrações sanitárias, enquadra como crime a ausência de notificação de doença ou zoonose transmissível (Artigo 10°, inciso VI), assim como obstrução ou impedimento de execução de medidas sanitárias (Artigo 10°, incisos VII e VIII). (BRASIL, 1977)

Com a criação do Código de Defesa do Consumidor (Lei n° 8078/90), a população adquiriu consciência de que produtos devem apresentar qualidade e segurança associados, e que a responsabilidade sobre este produto compete ao produtor ($BRASIL_B$, 1990).

Esta legislação catalisou um avanço considerável na Saúde Pública, pois permitiu a inversão do ônus da prova, onde o consumidor não precisa mais provar que está certo e sim o fornecedor é que tem que provar que não está errado (provar que o seu produto é próprio para consumo). Isso ofereceu um grande respaldo às ações de Vigilância Sanitária, que hoje em dia age em conjunto com a instância do Ministério Público compatível com sua esfera de governo. Ademais, a saúde é assegurada como um direito básico do consumidor, considerado o pólo mais vulnerável da relação, e o fornecedor tem obrigação de oferecer um produto inócuo (ROZENFELD, 2000; $BRASIL_B$, 1990).

Dessa forma, as indústrias alimentícias sentiram a necessidade do desenvolvimento de ferramentas de controle em todos os estágios da produção, com intuito de assegurar o rastreamento do produto e, dessa forma, a sua qualidade. Vários programas de qualidade têm sido utilizados pela indústria alimentícia. Entretanto, uma das suas ferramentas mais importantes é a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC ou HACCP) e as Boas Práticas de Fabricação (BPF), que passaram de ferramentas de qualidade a regulamentos, através da Portaria SVS/MS no. 326 de 30/07/97, da Portaria MAPA no. 368 de 04/09/97, da RDC no. 275 de 21/10/02 e da

Portaria MAPA no. 46 de 10/02/98 ($BRASIL_A$, 1997; $BRASIL_B$, 1997; BRASIL, 1998; BRASIL, 2002).

A confecção destes regulamentos reflete o envolvimento da Saúde Pública na prevenção e no monitoramento de riscos à saúde, onde os órgãos relacionados a esta buscaram implantar estudos epidemiológicos que oferecessem embasamento para ações corretivas e, principalmente, profiláticas na questão do risco das doenças relacionadas à cadeia alimentar, além do fornecimento de dados para o estabelecimento de parâmetros legais em normas técnicas. A Vigilância Sanitária, através dos indicadores epidemiológicos, elabora normas e realiza outras intervenções para avaliar e atuar em situações e locais que apresentam risco à saúde. Além destes indicadores, os dados de agravos ocasionados pelo consumo de alimentos, bebidas, medicamentos e outros produtos associados à saúde fornecidos pela Vigilância Epidemiológica também são de extrema valia na adequação e modificação de normas (VIANNA, 2001).

Todavia, situações como aglomeração humana, contato com resíduos (domésticos, hospitalares e industriais), circulação globalizada de mercadorias e contato com animais e vetores podem gerar condições incontroláveis para a circulação e multiplicação de patógenos. A verificação e o monitoramento dos microrganismos circulantes é uma das estratégias importantes para avaliar as ações de intervenção e normatização de produtos (como os alimentos), por fornecer dados que podem ser usados como parâmetros (VIANNA, 2001).

2.1.2.1. Programas brasileiros

2.1.2.1.1. Programa Nacional de Sanidade Avícola – PNSA – do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento: criado pela Portaria Ministerial MAPA n° 193 de 19/09/1994 (BRASIL, 1994). Esta portaria, além da criação do PNSA, delega competência ao Secretário de Defesa Agropecuária para baixar normas e cria o Comitê Consultivo deste programa. Já a Portaria SDA/MAPA n° 115 de 04/10/1995 determina as atribuições do Comitê (assessorar técnica e cientificamente), sendo reformulada pela de n° 39 (21/07/1999). Este programa, entre outras doenças aviárias, dispõe sobre salmoneloses aviárias (*S.* Enteritidis, *S.* Typhimurium, *S.* Pullorum e *S.* Gallinarum), descrevendo normas técnicas para laboratórios de diagnóstico, controle de núcleos

avícolas, certificação de propriedades livres destes sorovares de *Salmonella*, entre outras ações. O objetivo deste programa é controlar a produção de aves e ovos, visando diminuir o risco de contaminação por salmonelas aviárias dentro da indústria de alimentos (BRASIL, 1994; BRASIL, 1995; BRASIL, 1999).

2.1.2.1.2. Prebaf (Programa Nacional de Prevalência e Resistência de *Salmonella* em frangos) – ANVISA. É um programa de abrangência nacional, contando com a participação de Laboratórios de Saúde Pública (LACENs). Ainda está sendo implementado, de forma que o acesso a resultados é restrito.

2.1.2.1.3. Programa Nacional de Monitoramento da Resistência a Antimicrobianos em Enteropatógenos. Iniciado em 1997, avalia a prevalência e o perfil de suscetibilidade entre isolados de diferentes fontes. É um programa da OMS/OPAS desenvovido pelo Laboratório de Enterobactérias, Laboratório de Referência Nacional de Cólera e Enteroinfecções Zoonóticas e Health Canadá. Deste programa, participam 22 países da América Latina e, atualmente, ele foi extendido a todos os microrganismos de origem comunitária e hospitalar.

2.1.3. Salmonela em frangos e outros alimentos

No Brasil, não existem dados precisos sobre a prevalência de salmonela na população, todavia sua disseminação em ovos e carnes de aves, suína e bovina é relatada em trabalhos publicados (HOFER & REIS, 1994; OLIVEIRA *et al*, 2002; GEIMBRA *et al*, 2004). Como exemplo, o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ), em ação conjunta ao Serviço de Fiscalização Sanitária do Município do Rio de Janeiro (S/SCZ/CFS), evidenciou a presença do patógeno em 14,29% das amostras de cortes congelados de frango comercializados neste município em 1998 (BARRETO, 2001), sendo este resultado semelhante aos encontrados em outros sítios brasileiros (HOFER *et al*, 1997; TAVECHIO *et al*, 2002). Numa outra pesquisa envolvendo 115 suínos provenientes de abatedouros (15 destes de abate clandestino), 34,8% foram positivos para a pesquisa de *Salmonella* sp (ALVES *et al*, 2001);

2.2. O gênero *Salmonella*

Em 1885, o patologista Daniel Salmon, juntamente com Theobald Smith, descreveu o “hog cholera bacillus”, bactéria isolada de suínos, atualmente identificada como *Salmonella C*holerae-suis. Lignières, em 1900, denominou o gênero *Salmonella*, em homenagem ao patologista. Este nome foi validado pelo Sub-comitê Internacional de Sistemática Bacteriana, segundo a descrição de Bruce-White em 1929 (LE MINOR & POPOFF, 1987; BIESDORF, 1994).

A *Salmonella* é um dos gêneros pertencentes à família Enterobacteriaceae, descrita como um bacilo curto (1 a 2 μm), Gram negativo, anaeróbio facultativo, não formadora de esporos, geralmente móveis por flagelos peritríquios. Sua temperatura ótima de crescimento é de aproximadamente 37°C, sendo relativamente termossensíveis (são destruídas a 60°C por 15-20 minutos). Fermenta a glicose, com a produção de ácido e gás, porém é incapaz de fermentar a lactose e a sacarose. Sua classificação taxonômica tem mudado de acordo com o progresso das técnicas feno e genotípicas e, atualmente, são reconhecidas duas espécies deste gênero: *S. bongori* e *S. enterica*. Esta última é dividida em seis subespécies (*S. enterica*, *S. salamae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houtenae* e *S. indica*). Tanto as espécies como as subespécies podem ser diferenciadas através de provas bioquímicas e da combinação de fatores antigênicos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) (LE MINOR, 1988; POPOFF & LE MINOR, 2001).

Os antígenos somáticos (O) são polissacarídeos e estão ligados a um complexo lipídico (lipídio A), formando uma estrutura lipopolissacarídica denominada LPS, presente na membrana externa de bactérias Gram negativas. Os açúcares que formam a cadeia lateral deste polissacarídio variam na sua estrutura e no número de repetições, e são estruturas antigênicas. Dessa forma, conferem características imunológicas que são usadas para definir os sorogrupos e sorovares de *Salmonella*. Este aspecto é de grande valia em questões epidemiológicas. Em geral, os antígenos flagelares (H) ocorrem em duas fases (fase um e fase dois), sendo as salmonelas que os apresentam chamadas de bifásicas. Entretanto, algumas podem apresentar uma só fase (monofásica) ou nenhuma (imóveis). Em relação ao antígeno capsular (Vi), só existe um tipo com características antigênicas, sendo encontrado somente nos sorovares Typhi, Paratyphi C e Dublin. Com base na expressão dos antígenos, foi proposto o esquema de

Kauffmann & White, o qual agrupa salmonelas em tipos sorológicos e, de acordo com os antígenos em comum, em sorogrupos (Quadro 1). Dos sorovares mais comumente isolados, mais de 99% pertencem a *Salmonella enterica* subespécie *enterica*. (LE MINOR, 1993; POPOFF & LE MINOR, 2001; TRABULSI *et al*, 2002).

Quadro 1: Exemplo do esquema de classificação antigênica de *Salmonella*

Sorovar	Grupo	Antígeno O	Antígeno H	
			Fase 1	Fase 2
S. Typhimurium	B	1, 4, [5]*, 12	i	1, 2
S. Typhi	D	9, 12, [Vi]	d	___
S. Enteritidis	D	1, 9, 12	g, m	___
S. Paratyphi A	A	1, 2, 12	a	[1, 5]
S. Paratyphi B	B	1, 4, [5], 12	b	1, 2
S. Agona	B	1, 4, 5, 12	f, g, s	[1, 2]
S. Infantis	C	6, 7, 14	r	1, 5

Adaptado de FORSYTHE, 2002 e TRABULSI *et al*, 2002.

*[ ] Podem ocorrer ou não

Salmonelas podem infectar um vasto número de espécies animais (ubiqüitárias) ou estarem particularmente adaptadas a um hospedeiro específico. As ubiqüitárias são as maiores responsáveis por doenças transmitidas por alimentos (TRABULSI *et al*, 2002; LE MINOR, 1993).

A patogenicidade varia de acordo com o tipo sorológico e características do indivíduo. A *Salmonella* Typhi causa uma doença chamada febre tifóide, que apresenta sintomas como febre, diarréia, dor de cabeça e cólica abdominal, podendo evoluir para complicações neurológicas, esplênicas, hepáticas e respiratórias. A *Salmonella* Paratyphi (A, B e C) causa enfermidade similar à febre tifóide (SALYERS & WHITT, 1994).

Os outros sorovares de *Salmonella* são designados “não tifóides” e, usualmente, causam enterocolite autolimitante (SALYERS & WHITT, 1994). Todavia, crianças com menos de um ano de idade e portadores de alguns tipos de patologias – como anemia falciforme, esquistossomose, malária e verruga peruana – podem desenvolver grave infecção (TRABULSI *et al*, 2002). Pode citar-se como exemplo

meningite causada por *S.* Typhimurium em crianças em São Paulo (TRABULSI *et al*, 2002), artrite séptica em neonato na Índia também pelo sorovar Typhimurium (SARGUNA & LAKSHMI, 2005) e septicemia em neonatos num hospital do Rio de Janeiro por *Salmonella* Agona (ASENSI *et al*, 1994).

Ao ser ingerida pelo indivíduo, a salmonela passa pelo estômago – o tratamento térmico e a exposição a ácidos graxos de cadeia curta podem induzir a tolerância à acidez estomacal em patógenos – e chega ao intestino delgado, onde faz adesão na região apical dos enterócitos ou nas células M (localizadas sobre as Placas de Peyer) através de uma fímbria do tipo 1 manose-específica (BEARSON *et al*, 1997; BUCHAMAN & EDELSON, 1999; MARCUS *et al*, 2000; FORSYTHE, 2002; SANTOS *et al*, 2003).

Esta adesão provoca mudanças na superfície destas células, ocasionadas pelo alongamento e dilatação da membrana plasmática. Esta alteração é denominada arrepio ("ruffing") e é obtida por um rearranjo dos filamentos de actina e de outras proteínas do citoesqueleto. Dessa forma, há a formação de pseudópodos que engolfam a bactéria e a internalizam em uma vesícula endocítica. Entretanto, esta alteração é transitória e, após a internalização da bactéria, o citoesqueleto (e conseqüentemente a superfície celular) volta a sua distribuição normal.

Há a multiplicação bacteriana dentro das vesículas endocíticas e também dentro de fagossomas (quando englobadas por macrófagos). A salmonela sobrevive no interior de macrófagos por resistir às defensinas e aos estresses oxidativos (por apresentar as enzimas superoxidodismutase e catalase) produzidos. As bactérias atravessam a camada epitelial (transcitose) e se proliferam na lâmina própria, propiciando uma resposta inflamatória, causando enterocolite. Evidências sugerem que ainda haja a produção de uma enterotoxina no interior das células infectadas. Em infecções crônicas (três a quatro semanas após o quadro agudo), o paciente pode apresentar sintomatologia de artrite (SALYERS & WHITT, 1994; GERMANO & GERMANO, 2001; TRABULSI *et al*, 2002; SANTOS *et al*, 2003).

Dos genes necessários ao processo de adesão e de invasão ao enterócito, muitos se localizam na ilha 1 de patogenicidade da salmonela (SPI-1). Esta ilha de patogenicidade é relacionada com o sistema de secreção de toxina e codifica

aproximadamente 25 genes. Um grupo destes genes (*inv*) codifica as estruturas de superfície produzidas quando há aderência. As ilhas de patogenicidade da salmonela (SPI) são segmentos específicos do cromossomo, definidas como grandes cassetes de genes que codificam determinantes responsáveis pelo estabelecimento de interações específicas com o hospedeiro e que são requeridos para a virulência bacteriana. Em geral, as SPI apresentam um índice de CG menor (de 37 a 47%) que o do resto do cromossomo bacteriano (por volta de 52%). As SPI são altamente conservadas entre os diferente sorotipos de *Salmonella* e podem ser adquiridas pela transferência horizontal de fagos ou plasmídios de origem desconhecida. O sorovar Typhimurium apresenta no mínimo 5 ilhas de patogenicidade (Quadro 2) e possui cerca de 100 genes associados à virulência. (MARCUS *et al*, 2000; FORSYTHE 2002; SANTOS *et al*, 2003).

Contudo, além dos de origem cromossômica, as salmonelas também apresentam genes relacionados a virulência em um plasmídio de alto peso molecular (50 a 90 pares de quilobase ou kb), tendo sido um plasmídio de 95 kb identificado em cepas de *S*. Typhimurium (CHU *et al*, 1999; MARCUS *et al*, 2000). Ele é um importante marcador epidemiológico por seu uso ser indispensável à virulência deste sorovar. Entretanto, alguns autores consideram que um plasmídio de 60 kb é que seja o associado à virulência em *S*. Typhimurium, apesar de MARCUS *et al* e CHU *et al* associarem este tamanho (60 kb) ao plasmídio de virulência de *S*. Enteritidis. Algumas β-lactamases classe A aptas a hidrolisar cefalosporinas são mediadas por plasmídios e estão disseminadas entre *Salmonella* Typhimurium (BRUNNER *et al*, 1983; HOLMBERG *et al*, 1984; HELMUTH *et al*, 1985; WHILEY *et al*, 1988; VAHABOGLU *et al*, 1995; BAUERNFEIND$_A$ *et al*, 1996; BAUERNFEIND$_B$ *et al*, 1996; TRABULSI *et al*, 2002).

Alguns pacientes de salmoneloses, após infecção, tornam-se portadores assintomáticos (quando o patógeno coloniza a vesícula biliar) e – durante semanas, meses e, às vezes, anos – continuam eliminando o microrganismo nas fezes. Este representa um risco particular ao setor manipulador de alimentos, representando perigo de contaminação de produtos e disseminação do patógeno (BARRETO, 2001; TRABULSI *et al*, 2002).

O homem pode ser infectado por *Salmonella* sp através da ingestão de alimentos (carne bovina, de aves, suínos, frutos do mar, ovos, frutas, vegetais em geral,

entre outros) e águas que estejam contaminados. Entre os gêneros de microrganismos associados a doenças transmitidas por alimentos, *Salmonella* sp e *Campylobacter* sp contabilizam mais de 90% dos casos reportados no mundo. Ademais, estes dois patógenos têm aumentado a resistência a drogas de uso clínico de maneira preocupante. Segundo COHEN (2000), salmonelas multirresistentes a antimicrobianos tiveram um aumento na sua freqüência, passando de 17% em 1979 a 31% em 1994 nos EUA (McCLELLAND & PINDER, 1994; MILLEMANN *et al*, 1995; TIETJEN & FUNG, 1995; THORNS, 2000).

Todas as espécies e sorovares de *Salmonella* spp são patogênicas ao homem, ocasionando infecções de natureza entérica ou extraintestinal. Entretanto, na atualidade, uma das cepas mais comumente isoladas de fonte humana em muitos países da América do Norte, Europa, Ásia e África e que tem apresentado multirresistência associada é *Salmonella* Typhimurium DT104. Esta cepa tem apresentado um caráter epidêmico, sendo responsável pela re-emergência deste sorovar entre os patógenos mais isolados (HUMPHREY, 2001; VELING *et al*, 2002; RIBOT *et al*, 2002; VAN DUIJKEREN *et al*, 2002; LAILLER *et al*, 2002).

2.2.1. *Salmonella* Typhimurium.

No Brasil, relatórios apresentados por Rodrigues à Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública/CENEPI/MS retratam o aumento da incidência do sorovar Typhimurium entre cepas identificadas no Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ (RODRIGUES, 2000-2005).

Salmonella Typhimurium está amplamente disseminada no ambiente. Diversas espécies animais podem servir de reservatório a este microrganismo, proporcionando sua constante eliminação no meio, por animais infectados assintomáticos. Assim, sua disseminação entre espécies de animais destinadas à produção de alimentos tem representado um grande risco de contaminação da cadeia alimentar, considerada a sua principal via de transmissão (THRELFALL, 2002). Alguns trabalhos, inclusive, sugerem o trânsito de clones deste sorovar entre humanos e animais (O'BRIEN *et al*, 1982; WALL *et al*, 1994; SEYFARTH *et al*, 1997; KARIUKI *et al*, 2000; KARIUKI et al, 2005). Em geral, este é um sorovar presente em bovinos, suínos,

aves e, ocasionalmente, ovinos. *S.* Typhimurium pode ocasionar doenças em crianças e adultos (LEPAGE *et al*, 1990; GREEN & CHEESBROUGH, 1993; CHEESBROUGH *et al*, 1997; GUERRA *et al*, 2000; ARTHUR *et al*, 2001) e a veiculação através de alimentos se revela como um importante perigo, tendo em vista que a contaminação pode ocorrer em vários pontos da cadeia alimentar (THRELFALL, 2002). Este é o principal sorovar de origem doméstica causador de salmonelose humana na Finlândia, sendo o fagotipo DT1 considerado endêmico. Embora este fagotipo seja comum neste país, não está envolvido em surtos internacionais (LINDQVIST *et al*, 2004).

Por muitos anos, *S.* Typhimurium foi o sorovar mais envolvido em quadro de diarréia aguda no homem em diversos países, inclusive o Brasil (HOFER, 1974; LING *et al*, 1987; CHALKER & BLASER, 1988; TAUNAY *et al*, 1996; GUERRA *et al*, 2000), onde apresentou um grande aumento na sua incidência nas décadas de 60 e 70, chegando a 85,9% dos sorovares isolados em um hospital pediátrico em São Paulo (TAUNAY *et al*, 1971).

No panorama mundial, a emergência de *S.* Typhimurium multirresistente isolada a partir de animais de produção e o aumento concomitante de isolados multirresistentes de fonte humana no Reino Unido foram observados no período de 1975 até meados da década de 80. Estas cepas pertenciam predominantemente aos fagotipos 204, 193 e 204c (ROWE & THRELFALL, 1984).

Estes fagotipos se tornaram epidêmicos no Reino Unido e se espalharam para outros países da Europa, causando infecções no homem e animais na Alemanha, Bélgica, França e Itália (ROWE *et al*, 1979; SEYFARTH *et al*, 1997; PARRY *et al*, 1998). Eles também foram isolados na Índia e apresentavam os mesmos perfis plasmidiais (FROST *et al*, 1982). O fagotipo 193 apresentando multirresistência também foi evidenciado na Dinamarca (WEGENER *et al*, 1994) e na Espanha (CRUCHAGA *et al*, 2001).

De 1991 a 1994, houve um considerável aumento da incidência mundial de *S.* Typhimurium multirresistente, chegando a 62% dos isolados no Reino Unido em 1994 (FROST *et al*, 1995). Um fator importante neste aumento foi a disseminação epidêmica de uma cepa de *S.* Typhimurium pertencente ao fagotipo 104, que apresentava resistência a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e

tetraciclina (perfil ACSSuT), desta vez codificada pelo cromossomo (RIDLEY & THRELFALL, 1998; THRELFALL *et al*, 1994; BRIGGS & FRATAMICO, 1999; HUMPHREY, 2001; THRELFALL *et al*, 1996; SANDVANG *et al*, 1998).

Além do perfil ACSSuT, também foram encontrados, na população seguinte, isolados de *S*. Typhimurium DT104 resistentes a trimetoprim, ciprofloxacina, canamicina, ácido nalidíxico, fluoroquinolona e apramicina (THRELFALL$_A$ *et al*, 1996; LOW *et al*, 1997; THRELFALL, 2000; CRUCHAGA *et al*, 2001; ESAKI *et al*, 2004). A resistência à ciprofloxacina tem aumentado e provavelmente se deve ao uso de enrofloxacina (fluoroquinolona) na medicina veterinária (MALORNY *et* al, 1999; HUMPHREY, 2001). O uso contínuo pode ter exercido uma pressão seletiva na microbiota intestinal, selecionando mutantes DNA girase (gyr A). A resistência a este fármaco pode ser também pelo efluxo ativo, devido a superprodução da bomba de efluxo AcrAB (GIRAUD *et al*, 2000). A resistência a esta droga é um dado alarmante, pois há relato sobre duas pessoas que vieram a óbito por não responder ao tratamento por ciprofloxacina (uma fluoroquinolona) em uma infecção por *S*. Typhimurium DT104 (MOLBAK *et al*, 1999). A resistência ao trimetoprim e às sulfonamida foi mediada por um plasmídio de aproximadamente 4,6 MDa (POPPE *et al*, 1998)).

O padrão de resistência antimicrobiana da *S*. Typhimurium DT104 é muito ativo. Alguns trabalhos sugerem que *S*. Typhimurium DT104 multirresistente a antibióticos é mais patogênica que outras salmonelas não resistentes. Um estudo realizado por CARLSON *et al* (2002) demonstrou que este fagotipo pode causar abomasite em bezerros, uma doença geralmente causada por *Clostridium perfringens* tipo A. No homem, há relato de casos de septicemia nos Estados Unidos (WALL *et al*, 1994; EVANS & DAVIES, 1996; ELLIS *et al*, 1983; ROEDER *et al*, 1987; MILLER, 1997).

Mesmo com a predominância mundial do sorovar Enteritidis nas últimas três décadas (NASTASI & MAMMINA, 1996; NYLEN *et al*, 1999) e relatos da disseminação deste sorovar no Brasil a partir da década de 90 (ARAÚJO *et al*, 1995; KAKU *et al*, 1995; TAVECHIO *et al*, 1996; SANTOS & KUPEK, 2000), ainda assim o sorovar Typhimurium apresenta importância em relação aos isolados humanos. Um estudo realizado em espécimes de *Salmonella* sp isolados de crianças no período de

1987 a 1992 revelou uma freqüência de 62,93 % desse sorovar (ASENSI & HOFER, 1994).

Ademais, mesmo com o decréscimo do número de isolados em salmonelose pelo sorovar Typhimurium quando comparado ao sorovar Enteritidis, o primeiro apresentou duas características muito relevantes em relação a sua patogenicidade: um elevado potencial de aquisição de resistência aos antimicrobianos e uma aparente predileção para causar doença grave. Por outro lado , múltipla resistência em *S*. Enteritidis era considerada rara (WALL *et al*, 1994; MILLER, 1997; CRUCHAGA *et al*, 2001; GALES *et al*, 2002; THRELFALL, 2002; YANG *et al*, 2002; BIENDO *et al*, 2003; MARTIN *et al*, 2004).

2.3. Resistência a antimicrobianos

O quadro a seguir resume os antibióticos mais comumente utilizados nas clínicas humana e veterinária e na agricultura.

Quadro 2: Divisão dos antimicrobianos segundo seus mecanismos de ação.

Modo de Ação		Fármaco	Comentários
Inibição de síntese de parede celular	Penicilinas Naturais	Penicilina G Penicilina V	Para Gram positivos
	Penicilinas Semi-sintéticas	Oxaciclina Ampicilina Aztreonam Imipinem	Resistente à penicilinase Amplo espectro Monobactâmico eficiente contra Gram negativas Carbapenêmico, espectro muito amplo
	Cefalosporinas	Cefalotina Cefoxitina Ceftriaxona	1ª. geração, atividade semelhante à penicilina 2ª. geração 3ª. geração
Inibição de síntese protéica	Cloranfenicol		Amplo espectro. Potencialmente tóxico
	Aminoglicosídeos	Estreptomicina Gentamicina	Amplo espectro
	Tetraciclinas	Tetraciclina Oxitetraciclina Clortetraciclina	Amplo espectro, incluindo clamídias e riquétsias. Usado como aditivos de alimentos de animais
	Macrolídeos	Eritromicina	Alternativa à penicilina
Lesão na membrana plasmática	Polimixina B		Uso tópico, contra Gram negativos
Inibição da síntese de ácido nucléico	Quinolonas e fluoroquinolonas	Ácido Nalidíxico Norfloxacina Ciprofloxacina Enrofloxacina	Inibem síntese de DNA. Amplo espectro. Enrofloxacina usada em Medicina Veterinária.
Inibição competitiva da síntese de metabólitos	Sulfonamidas	Trimetoprim-Sulfametoxazol	Amplo espectro, combinação geralmente usada.

Além da ampla disseminação de *Salmonella*, um aspecto altamente relevante refere-se à resistência antimicrobiana, atualmente reconhecida por sua emergência, especialmente naqueles isolados de produtos de origem animal (MURRAY, 1986; EVANS & DAVIES, 1996; ; GAZOULI *et al*, 1996; WHO, 1997; LEACH *et al*, 1999; VAN DER WOLF *et al*, 1999; CHANG, 2000; NETO, 2001).

A ocorrência de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos dificulta a escolha terapêutica, representando um fator agravante no controle da infecção humana e animal. Este tema tem alertado diversas instituições, como a Organização Mundial da Saúde (OMS), Escritório Internacional de Epizootias (OIE) e Codex Alimentarius, que vêm discutindo possíveis soluções globais para este problema.

Cepas de *Salmonella* spp. resistentes a drogas estão disseminadas em países tanto desenvolvidos como em desenvolvimento. Nestes últimos, THRELFALL (2002) associa o aumento da resistência principalmente ao uso indiscriminado de antibióticos na clínica humana, tanto em hospitais como em comunidades. Nos países desenvolvidos, porém, ele ressalta que salmonelas zoonóticas adquirem sua resistência nos hospedeiros animais (usados na produção de alimentos) pelo uso de antimicrobianos nestes, antes da sua posterior transmissão a humanos através da cadeia alimentar. Este autor também ressalta que, em países em desenvolvimento, cepas do mesmo sorovares estão associadas com alta incidência de doença invasiva e possuem resistência mediada por plasmídio. Estas características epidemiológicas diferenciam estas cepas das de mesmo sorovar em países desenvolvidos.

Em vários países, antibióticos têm sido usados na agricultura desde a década de 40. Todavia, nos anos 50 sua utilização foi ampliada, através do uso de subdosagens terapêuticas como suplementos alimentares para promoção de crescimento em animais de produção. Associado a esta prática, a mistura de animais de diferentes origens contribuiu para a disseminação de infecções por *S.* Typhimurium resistentes entre bovinos (RABSCH *et al*, 2001).

THRELFALL & WARD (1993) associaram os sorovares multirresistentes isolados de humanos com aqueles de alimentos de origem animal, sendo a multirresistência reflexo do uso de antimicrobianos na produção animal. No Brasil, produtos veterinários têm fiscalização prevista na legislação desde o final da

década de 60, sendo regulamentados no respeito à fabricação, à comercialização e ao uso destes produtos. Entre os produtos veterinários de uso autorizado no território nacional estão os antimicrobianos, que podem ser usados na prevenção e tratamento de enfermidades infecciosas, assim como na melhoria do desenvolvimento de animais produtores de alimentos (promotores de crescimento). O uso destas subdosagens terapêuticas ocasionou o aparecimento de plasmídios que codificam multirresistência (MR) e gerou impasses no tratamento de humano e de animais (FEINMAN, 1998).

O surgimento de *Salmonella* spp resistentes a cefalosporinas de última geração tem sido apontado como sendo associado a plasmídios transferíveis. Na Rússia, seis isolados de *S.* Typhimurium de fontes ambiental e humana, apresentaram resistência a penicilina, cefotaxima, ceftriaxona, aztreonan, gentamicina, trimetoprim, tetraciclina e cloranfenicol sendo porém sensíveis a ceftazidima. Estudo sobre seus mecanismos de resistência permitiu observar que um plasmídio de 12 kb era o responsável pela resistência a β-lactâmicos, pela produção de uma β-lactamase denominada "cefotaximase" apresentando ponto isoelétrico de 8,4 (GAZOULI *et al*, 1998). A pesquisa de genes de β-lactamases tem sido realizada com a técnica de PCR e cepas produtoras de β-lactamases de amplo espectro (ESBL) têm sido isoladas, algumas apresentando um plasmídio com mais de 100 MDa (151 kb). Um plasmídio transferível de 100 a 110 kb que codifica múltipla resistência foi encontrado tanto em *S.* Typhimurium quanto em *S.* Enteritidis de fontes humana e animal (BAUERNFEIND *et al*, 1992; ROSSI *et al*, 1995; VAHABOGLU *et al*, 1995; $\text{BAUERNFEIND}_{\text{A}}$ *et al*, 1996; $\text{BAUERNFEIND}_{\text{B}}$ *et al*, 1996; OTKUN *et al*, 2001; KARIUKI *et al*, 2002; YANG *et al*, 2002).

A resistência a antimicrobianos se tornou comum em *S.* Typhimurium em meados da década de 60, mas teve um aumento drástico na de 90. Mundialmente, o número de cepas que apresentam resistência às drogas antimicrobianas, inclusive cefalosporinas de amplo espectro e quinolonas, tem aumentado significantemente, sendo esta relatada em diversos estudos (THRELFALL, 2002; PARRY, 2003; WITTE, 2004).

Em relação aos genes responsáveis pela resistência a antimicrobianos, muitos se encontram amplamente distribuídos entre as enterobactérias, como os genes *aadA*2, bla_{PSE-1} e *sul*I. Todavia, dois genes encontrados em cepas de *S.* Typhimurium

DT104 (*floR*, conferindo resistência a florfenicol, e *tet(G)*, para resistência a tetraciclina) provavelmente não apresentam origem enterobacteriana, sugerindo uma transferência horizontal entre espécies (CLOECKAERT *et al*, 2000). A transferência dos genes de resistência encontrados na *S.* Typhimurium DT104 (localizados em uma ilha genômica) pode ocorrer entre cepas do mesmo sorovar (justificando a alta clonalidade) ou de diferentes, como o sorotipo Agona (CLOECKAERT & SCHWARZ, 2001). GLYNN *et al* (1998) identificaram integrons classe I no cromossomo de diferentes sorovares de salmonelas que apresentaram o perfil pentarresistente. Este perfil pode ocorrer também entre outros fagotipos, como o DT120. Uma possibilidade é que esta transferência possa ser mediada por fagos (CARATTOLI *et al*, 1998).

Deste modo, as formas de aquisição de resistência podem ser por alterações no cromossomo ou por transferência intercelular cuja emergência geralmente ocorre devido à seleção de um clone resistente desta bactéria. Outros fagotipos emergentes têm sido comparados ao DT104 em relação a clonalidade de cepas multirresistentes, como *Salmonella* Typhimurium MR (multirresistente) U302. Este último pode ter os mesmos padrões e similaridade no plasmídio R que *Salmonella* Typhimurium DT104, embora constitua um clone distinto abrigando diferentes genes de resistência (WALKER *et al*, 2001). Embora a multirresistência emergente esteja associada a *S.* Typhimurium DT104, outros fagotipos também podem apresentá-la, indicando que o DT104 não é a única fonte de multirresistência a antimicrobianos (YANG *et al*, 2002).

A clonalidade de cepas, em especial as que apresentam resistência múltipla a drogas antimicrobianas, é um assunto de interesse do estudo epidemiológico. O clone pode ser definido como isolados geneticamente relacionados que são indistintos através de vários métodos moleculares de tipagem ou isolados tão similares que seja presumível a ancestralidade em comum (TENOVER *et al*, 1995).

A disseminação de clones multirresistentes propicia danos à saúde pública, saúde animal e setor econômico (com perdas ocasionadas pela doença, como gastos hospitalares, medicamentos, absenteísmo, etc). Dessa forma, a pesquisa da prevalência ou circulação de cepas e seus clones é tarefa importante e necessária. Para isso, tanto os métodos clássicos quanto os moleculares de rastreamento epidemiológico são úteis (DAVIES *et al*, 2002).

2.4. Fagotipagem

A técnica de fagotipagem (ou lisotipia), em si, consiste na exposição da cultura bacteriana a uma coleção definida de bacteriófagos e sua posterior caracterização de acordo com a suscetibilidade apresentada. Para *S.* Typhimurium, a fagotipagem é o método de subtipagem padronizado internacionalmente para investigações epidemiológicas de isolados de diferentes fontes, sendo considerado o método fenotípico primário de subdivisão para este sorovar (THRELFALL & FROST, 1990).

Na atualidade, esta técnica tem revelado sua importância na caracterização de uma cepa mundialmente epidêmica, a *S.* Typhimurium DT104, cujo fagotipo está associado a um perfil de multirresistência a antimicrobianos (BOLTON *et al*, 1999; ABOUZEED *et al*, 2000; BAGGESEN *et al*, 2000; THRELFALL, 2000; CLOECKAERT & SCHWARZ, 2001; MALORNY *et al*, 2001; MURPHY *et al*, 2001; WHITE *et al*, 2001; GEBREYES & ALTIER, 2002; THRELFALL, 2002).

A diferenciação dentro dos fagotipos pode ser alcançada por outros métodos fenotípicos, como antibiograma, e por métodos moleculares, como perfil plasmidial, PFGE, PCR, Ribotipagem, entre outros (HAMPTON *et al*, 1995; MARKOGIANNAKIS *et al*, 2000; LIBEANA *et al*, 2002).

2.5. Métodos moleculares

Durante muito tempo, a caracterização bacteriana manteve uma abordagem meramente descritiva, utilizando apenas a observação de caracteres morfológicos. Tal procedimento permitia uma capacidade de discriminação muito baixa. Com o desenvolvimento tecnológico e identificação de novos caracteres, a capacidade de separação de subpopulações dentro de um mesmo grupo, até então supostamente homogêneo, teve um crescimento significativo. Entretanto, a grande maioria das metodologias utilizadas possui aplicação restrita a um grupo específico de microrganismos, não podendo ser estendido de uma forma mais abrangente. Tal observação é válida para técnicas sorológicas, de fagotipagem e comportamento bioquímico, entre outras (FARBER, 1996). Segundo HEIR *et al* (2002), perfis

bioquímicos, sorológicos e fagotípicos são usados no isolamento e caracterização de *Salmonella* na rotina de laboratórios de referência, mas devido ao baixo poder de discriminação destes métodos, estes se tornam de uso limitado como instrumentos de distinção nos estudos epidemiológicos.

Mais recentemente, o intenso desenvolvimento de metodologias de Biologia Molecular tornou possível a quantificação de similaridade mediante homologia entre genes ou a expressão dos mesmos. Tais técnicas apresentam alto grau de especificidade e sensibilidade, tendo a metodologia de hibridização DNA/DNA uma crescente aceitação no meio científico, como referência em estudos taxonômicos. Devido a essas características, métodos moleculares revolucionaram a epidemiologia, pois permitiram a comparação de genes entre isolados e não só a expressão fenotípica destes genes, como é observado nos métodos convencionais, possibilitando a rastreabilidade de cepas, no condizente à clonalidade, possíveis reservatórios, fontes, resistência, etc (FARBER, 1996).

Análises moleculares de componentes da ultra-estrutura bacteriana, como proteínas da membrana externa, ácidos nucléicos e lipopolissacarídeos, são os métodos de eleição para caracterização de cepas. Estes métodos são amplamente aceitos por apresentarem técnicas altamente discriminatórias, além de programas analíticos computadorizados – “softwares” cujas aplicações alcançam níveis de comparação filogenética (FARBER, 1996; KONEMAN *et al*, 2001).

Desde a década passada, estratégias clássicas de avaliação de variabilidade genética têm sido complementadas por técnicas moleculares. Isto inclui a análise dos constituintes químicos e principalmente a caracterização de macromoléculas. O desenvolvimento dos “marcadores moleculares” baseados no polimorfismo de proteínas ou DNA tem sido responsável pela tipificação molecular. Existe diversidade genética suficiente para permitir a identificação de clones ou grupos clonais. O uso de marcadores epidemiológicos específicos pode permitir, então, o monitoramento de cepas (TENOVER *et al*, 1995; HEIR *et al*, 2002).

A subtipagem molecular de microrganismos é uma ferramenta de extrema valia, pois parte do princípio que todo ser vivo tem seu código genético, logo toda cepa pode ser tipificada. Além disso, essas técnicas permitem um maior poder discriminatório, dado que até cepas estreitamente relacionadas podem ser diferenciadas (FARBER, 1996).

Muitas técnicas moleculares têm sido reportadas, como análise de perfil plasmidial, análise por endonuclease de restrição do plasmídio ou do DNA cromossomial, ribotipagem, tipagem IS200, RFLP (polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição) e PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) (FARBER, 1996; SEYFARTH *et al*, 1997; BENDER, 2001; EBNER & MATHEW, 2001; MALORNY *et al*, 2001; SOOD *et al*, 2002).

Na subtipagem de *S.* Typhimurium, vários métodos moleculares têm sido utilizados, como comparação dos perfis plasmidiais, ribotipagem, IS200, Ribotipagem-PCR, RAPD e PFGE (MILLEMANN *et al*, 1995; ASENSI *et al*, 1995; TSEN *et al*, 2000; WILSHAW *et al*, 1980; HOLMBERG *et al*, 1984; OLSEN *et al*, 1997; MARTINEZ-URTAZA *et al*, 2004; DALY *et al*, 2005).

A análise do perfil plasmidial tem sido usada em estudos epidemiológicos de *S.* Typhimurium e reportada como, ao menos, tão específica quanto a fagotipagem. A troca de plasmídios entre sorovares é baixa e os plasmídios são relativamente estáveis, permitindo seu uso como um método de classificação. É a única técnica que avalia o DNA extracromossômico e apresenta como vantagem a sua simplicidade de execução. Entretanto, alguns sorovares parecem não apresentar plasmídios, o que representa uma desvantagem ao se usar esta técnica para classificar salmonelas. Além disso, podemos observar plasmídios de seqüências nucleotídicas diferentes que apresentam peso/tamanho iguais na análise do gel de eletroforese. Uma alternativa a essa última desvantagem é a utilização de endonucleases de restrição. De uma forma geral, esta técnica é recomendada para estudos epidemiológicos em regiões geográficas e tempo limitados e como complemento a outras técnicas mais refinadas (OLSEN *et al*, 1993; FARBER, 1996; LINDQVIST *et al*, 1999)

2.5.1. Análise Plasmidial e PFGE

A técnica de PFGE é um tipo especial de RFLP. Na PFGE, suspensões de microrganismos íntegros são colocadas em agarose, lisadas *in situ* e tratadas com enzimas de restrição. A ação destas últimas origina fragmentos relativamente grandes, que são submetidos a eletroforese em um campo elétrico onde as polaridades são esporadicamente invertidas (ao invés de se manterem constantes). Este método produz poucos fragmentos de DNA amplos, que ficam nitidamente separados por bandas desenvolvidas pela eletroforese. A análise PFGE foi aplicada em estudos epidemiológicos de diversos microrganismos. Segundo HEIR *et al*, a técnica de PFGE é uma das mais discriminativas e de relevância epidemiológica, tornando-a um dos procedimentos de tipagem mais fidedignos (FARBER, 1996; KONEMAN *et al*, 2001; HEIR *et al*, 2002).

Tanto para o sorovar Typhimurium quanto para Enteritidis, a técnica do PFGE tem se apresentado como uma ferramenta poderosa de discriminação entre cepas do mesmo fagotipo. Além disso, o PFGE também mostrou maior discriminação entre isolados quando comparado com outros métodos. Por exemplo, TSEN *et al* não conseguiram diferenciar pelo RAPD cepas agrupadas por PFGE e pela análise plasmidial. Num estudo com 60 cepas, RIDLEY *et al* compararam PFGE com análise do perfil plasmidial e com ribotipagem e observaram que a técnica de PFGE foi mais discriminatória (RIDLEY *et al*, 1998; TSEN *et al*, 2000; HOLMBERG *et al*, 1984; OLSEN *et al*, 1994; MURASE *et al*, 1995). Em relação às enzimas utilizadas na técnica de PFGE para isolados de *S.* Typhimurium, muitos trabalhos usaram as enzimas *Xba*I, *Spe*I, *Sfi*I, *Bln*I, *Avr*II, ou combinações destas (TSEN *et al*, 2000; DALY & FANNING, 2000; MHAND *et al*, 1999; BAGGESEN *et al*, 2000; GORMAN & ADLEY, 2004; ON & BAGGESEN, 1997; LING *et al*, 2001; MURPHY *et al*, 2001).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a circulação de *Salmonella* Typhimurium na cadeia alimentar através de técnicas de rastreamento clássicas e moleculares, com particular ênfase para os clones multirresistentes, visando prever a introdução de cepas de características reconhecidamente epidêmicas em nosso meio.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a distribuição de *Salmonella* Typhimurium nas diferentes fontes, em análise comparativa com aquelas caracterizadas nos últimos cinco anos;

- Determinar, entre cepas multirresistentes (resistentes a três ou mais diferentes grupos de fármacos), o perfil genético através do DNA plasmidial;

- Caracterizar os fagótipos mais incidentes de *Salmonella* Typhimurium em nosso meio;

- Efetuar o rastreamento molecular da circulação de *Salmonella* Typhimurium através de análise comparativa do perfil genômico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do presente trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Enterobactérias (LABENT) do Departamento de Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

Numa média anual, o LABENT recebe 10.000 cepas de *Salmonella* sp enviadas por laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios de Saúde Pública, Universidades, Laboratórios de Referência do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e empresas particulares. Estas cepas vêm acompanhadas de fichas contendo informações sobre seu perfil epidemiológico, conforme orientação prévia do LABENT, sendo submetidas à confirmação bioquímica e caracterização antigênica conclusiva.

Todas as cepas oriundas de alimentos e de humanos e uma amostragem das oriundas de animais, matéria-prima, ambiente e controle da qualidade de empresas privadas são submetidas ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos. Essas informações são armazenadas em um banco de dados utilizando o programa Excel.

4.1. Seleção e tratamento dos isolados

4.1.1. Amostragem

Com base na consulta ao banco de dados da coleção *Salmonella* sp do LABENT, foram selecionadas cepas do sorovar Typhimurium que apresentassem resistência a um ou mais grupos de fármacos antimicrobianos, no período de janeiro de 1999 a dezembro de 2003. Além destas, também foram selecionados todos os isolados oriundos de Laboratórios Públicos (tanto do Ministério da Saúde quanto da Agricultura) que não houvessem sido submetidos ao teste de suscetibilidade aos antimicrobianos neste intervalo de tempo.

Obteve-se um total de 390 cepas selecionadas segundo estes critérios. Os isolados foram agrupados de acordo com a fonte de isolamento (alimento, animal, ambiente, matéria-prima/ração e humana) e a região geográfica (centro-oeste, nordeste, norte, sudeste e sul), conforme o observado na Quadro 3.

Quadro 3: Distribuição dos isolados utilizados no presente estudo segundo o ano, região geográfica e fonte de isolamento.

ANO	FONTE	Região geográfica					Total
		N	NE	S	SE	CO	
1999 (n=76)	humana			3	1		4
	alimento			21	15	2	38
	animal			11	7		18
	matéria-prima			13			13
	ambiente	2		1			3
2000 (n=55)	humana			1		1	2
	alimento			5	4	1	10
	animal			20	8		28
	matéria-prima			4	1		5
	ambiente			6	4		10
2001 (n=95)	humana	1		2			3
	alimento			15	3	9	27
	animal			21	7	8	36
	matéria-prima			8	2		10
	ambiente			5	14		19
2002 (n=101)	humana	6	2	4		2	14
	alimento		2	29	13	1	45
	animal			13	7		20
	matéria-prima			7	6	1	14
	qualidade				1		1
	ambiente	2		4	1		7
2003 (n=63)	alimento			18	13	13	44
	animal			7	1	5	13
	ambiente			2			2
	humana			1	2		3
	matéria-prima				1		1
Total		11	4	221	111	43	390

N: Norte; NE: Nordeste; S: Sul; SE: Sudeste; CO: Centro-oeste.

4.1.2. Caracterização bioquímica

As cepas mantidas em temperatura ambiente em agar nutriente fosfatado (COSTA & HOFER, 1972) foram inoculadas em caldo nutriente (DIFCO) a 37°C por 12-18 horas e posteriormente semeadas em agar Entérico Hektoen (OXOID). As colônias características de *Salmonella* sp foram repicadas para o meio de triagem de Costa & Vérnin (COSTA & HOFER, 1972) e incubadas a 37°C por 18-24 horas. Na caracterização bioquímica, foram avaliadas a capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono em meio citrato de Simmons (DIFCO) assim como a mobilidade, a produção de gás sulfidrico e a ausência da produção de indol através do meio SIM (COSTA & HOFER, 1972).

Com a confirmação dos isolados como pertencentes ao gênero *Salmonella*, estes foram semeados em dois tubos de ensaio contendo agar nutriente inclinado (DIFCO) e em outro contendo caldo BHI (DIFCO), sendo incubados a 37°C por 18-24 horas. Ao término deste prazo, as cepas em agar nutriente foram mantidas na câmara fria (um dos tubos de ensaio) e as em caldo BHI acrescidas de glicerol 20% e mantidas em “freezer” a –20°C.

4.1.3. Caracterização antigênica

O crescimento obtido no segundo tubo de ensaio contendo agar nutriente foi suspenso em solução salina a 0,85% para a caracterização antigênica (POPPOF & LE MINOR, 2001; EWING, 1986).

O teste realizado foi o de soroaglutinação rápida em placa, utilizando os antissoros polivalentes e monovalentes somáticos (O) e flagelares (H) para confirmação da estrutura antigênica característica do sorovar Typhimurium – 1, 4, 12 (grupo B): i (fase 1): 1, 2 (fase 2).

4.2. Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos

Para verificação da suscetibilidade dos isolados foram utilizados os seguintes antimicrobianos da marca OXOID: tetraciclina (TCY 30 μg), ampicilina (AMP 10 μg), ácido nalidíxico (NAL 30 μg), cloranfenicol (CHL 30 μg),

sulfametoxazol-trimetoprim (SXT 30 μg), nitrofurantoina (NIT 300 μg), cefalotina (CEP 30 μg), cefoxitina (FOX 30 μg), ceftriaxona (CRO 30 μg), gentamicina (GEN 10 μg), ciprofloxacina (CIP 5 μg), imipenem (IPM 10 μg).

Estes fármacos foram escolhidos com base nas orientações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para drogas a serem utilizadas no monitoramento da resistência bacteriana, expressas no manual da CLSI, e nas drogas utilizadas pelas clínicas humana e veterinária.

O método utilizado foi o preconizado pelo "National Committee for Clinical Laboratory Standads" (CLSI, 2003/2004) para o teste de difusão de discos impregnados com antimicrobianos em placas de agar.

A partir da cultura de 24 horas a 37°C em placa de agar nutriente (DIFCO), foram selecionadas de cinco a dez colônias, as quais foram inoculadas em caldo Mueller-Hinton (OXOID) e incubadas a 37°C até que obtivessem turvação 0,5 na escala de MacFarland, sendo o inóculo padronizado através do espectrofotômetro (VITEK).

Este crescimento bacteriano foi semeado na superfície de placas contendo agar Mueller-Hinton (OXOID) com uso de um "swab" esterilizado e os discos de antimicrobianos foram depositados sobre a placa com o auxílio de um dispensador de discos (OXOID).

As placas foram incubadas a 35°C por 18-24 horas e então observou-se a presença ou não de halos de inibição, assim como seu diâmetro, verificado através do uso de um paquímetro digital. Os valores dos diâmetros obtidos foram comparados com a tabela dos valores de referência fornecida pelo CLSI.

As cepas padrão empregadas para controle da qualidade da execução do método e da confiabilidade dos resultados obtidos foram *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Ressalta-se que estas cepas padrão foram submetidas aos mesmos testes e condições de cultivo.

4.3. Análise Plasmidial

Para a determinação do perfil plasmidial (número e peso aproximado dos plasmídios existentes), foi utilizada a técnica de lise alcalina descrita por BIRBOIM & DOLY (1979), modificada por SAMBROOK *et al* (1989).

Foram selecionadas, aleatoriamente, 99 das 346 cepas resistentes a antimicrobianos. As amostras e as cepas padrão foram inoculadas em caldo Lurian-Bertani (LB) a 37°C por 16-20 horas sob agitação. Deste crescimento, foi transferido 1,5 mL para tubo do tipo "eppendorf", o qual foi centrifugado a 13.000 G durante 30 segundos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado.

A primeira etapa da extração plasmidial é a ruptura da parede celular. Para isso, cada precipitado foi ressuspenso em 100 μL da Solução I (ver apêndice), homogeneizado em vórtex e mantido a temperatura ambiente por 5 minutos.

A etapa seguinte foi a de lise parcial da membrana celular. Para isso, foram adicionados 200 μL de Solução II (ver apêndice) e os tubos foram homogeneizados cuidadosamente por inversão de posição. Em seguida, foram mantidos em banho de gelo por 7 minutos. Nesta etapa, houve a liberação do DNA plasmidial, que foi desnaturado. Houve também a formação de complexos SDS-proteínas e SDS-RNA.

A terceira etapa da extração foi a precipitação dos complexos obtidos na etapa anterior e do DNA de alto peso molecular (geralmente cromossômico), além da renaturação do DNA plasmidial. Foram adicionados 150 μL de Solução III (ver apêndice), homogeneizados por inversão de posição e mantidos em banho de gelo por 5 minutos. Após este prazo, foram centrifugados a 13.000 G por 12 minutos a 4°C, retirando um volume de 250 μL de sobrenadante (contendo o DNA plasmidial) e transferindo para outro tubo do tipo "eppendorf", contendo 500 μL de etanol absoluto. Foi realizada a homogeneização por inversão e os tubos do tipo "eppendorf"s mantidos a -20°C "overnight".

No dia seguinte, os tubos do tipo “eppendorf”s foram centrifugados a 13.000 G por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado ressuspenso em 1 mL de alcool a 70° gelado, homogeneizado por inversão e em seguida, centrifugado a 13.000 G por 5 minutos a 4°C, desprezando-se o sobrenadante. O sedimento obtido, depois de seco, foi ressuspenso em 30 μL de solução de RNAse (20 mg/mL) e incubado a 37°C por 30 minutos. Foram adicionados 20 μL de tampão carreador e as amostras aplicadas no gel de agarose.

O gel foi preparado numa concentração de 0,7% de agarose (SIGMA-A6877) em TBE 0,5X, solubilizado e mantido a 50°C até a hora do envase na forma (suporte com 11 x 14 cm), utilizando-se um pente formador de 20 poços. Após o preparo e solidificação do gel, este foi colocado em uma cuba horizontal de eletroforese, imerso em tampão TBE 0,5X (500 mL). Os orifícios (poços) formados no gel foram preenchidos com as amostras (15 μL) e com o padrão na extremidade esquerda (cepa de *Escherichia coli* 39R861, conforme THRELFALL *et al*, 1986). O padrão foi definido com os plasmídios de 98, 42, 24 e 4,6 MDa desta cepa. Para a estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios, utilizou-se o “software” da Amersham Pharmacia Biotech, o “Image Master Total Lab”, versão 2,0. Além disso, foi “plotada” uma curva de migração em papel semilog [$\log_{10}$MDa X distância (mm)] a partir da localização fotográfica dos plasmídios das cepas-padrão.

4.4. Fagotipagem

A avaliação dos fagotipos prevalentes de *S*. Typhimurium foi realizada na totalidade das cepas selecionadas. Foram utilizados os preparados fágicos fornecidos pelo “Public Health Laboratory Service” (Inglaterra), Centro de Referência Internacional de Fagotipagem. O método utilizado foi o preconizado por Callow (CALLOW, 1959) e Anderson (ANDERSON *et al*, 1977).

As cepas foram inoculadas em Caldo Fago e incubadas a 37°C até atingirem turvação 2 na escala de MacFarland, sendo então semeadas em placas de Agar Fago e estas colocadas abertas em fluxo laminar até que a suspensão fosse totalmente absorvida.

A seguir, cada um dos preparados fágicos específicos para o sorovar Typhimurium foi gotejado sobre as placas, aguardando-se um intervalo médio de dez minutos para que estes preparados fossem absorvidos.

Em seguida, foram incubadas a 37°C por 18 horas e procedeu-se a leitura das lises presentes, com o auxílio da tabela dos fagotipos. A leitura foi realizada utilizando as seguintes classificações: confluente, semi-confluente, opaca e número de placas de lise.

4.5. Eletroforese em campo pulsado (Pulsed Field Gel Electrophoresis – PFGE)

Com base no perfil epidemiológico e nos resultados obtidos a partir da lisotipia e do teste de resistência a antimicrobianos, realizou-se a avaliação em amostragem representada por 13 das 26 cepas isoladas de fonte humana. Nesta avaliação, buscou-se também a representação de cada região geográfica e ano de isolamento.

Para esta técnica, foram seguidos os critérios definidos por PFALLER *et al* (1992), BIRREN & LAI (1993), TENOVER *et al* (1995) e OLIVE & BEAN (1999), com modificações realizadas para adequação ao sorovar Typhimurium.

Pelo fato da técnica de PFGE necessitar do DNA íntegro, as cepas tiveram seu material cromossômico contido em um bloco de agarose, onde sofreu todo o tratamento para extração, purificação e digestão do DNA.

4.5.1. Preparação dos blocos de agarose contendo o DNA bacteriano

Foram testadas três opções de protocolo (opções 1, 2 e 3), variando principalmente na preparação dos blocos de agarose.

Nessa primeira etapa (opção de protocolo n° 1), a partir de culturas de 24h em ágar nutriente (0,5g% NaCl, DIFCO) foi semeada uma colônia por amostra, em tubos contendo 10 mL de Caldo Tripticase de Soja ou de caldo Mueller-Hinton (OXOID), incubados em banho-maria com agitação a 37°C por 12-18 horas. No dia seguinte, tubos do tipo "eppendorf" vazios foram numerados e pesados e as culturas de

Salmonella Typhimurium centrifugadas por 15 minutos a 3000 G. Com a centrifugação, foi possível aspirar os sobrenadantes e desprezá-los, ressuspendendo cada precipitado em 1mL de salina esterilizada (0,85g% NaCl). As suspensões obtidas foram transferidas para os tubos do tipo "eppendorf" previamente pesados e novamente centrifugadas durante 15 a 30 segundos a 12000 G/4°C. Depois de retirar o máximo possível de salina, os precipitados foram pesados, e se considerou como pesos ideais aferições de 20 a 30µg. Volumes de salina esterilizada (em µL) correspondentes a cada peso (em µg) foram adicionados, homogeneizando-se através de um aparelho "Vortex". No preparo do gel, utilizou-se a agarose Low Melting Point a 2% (SIGMA), que foi mantida a 50°C após sua dissolução, até o momento da moldagem dos blocos. Uma mistura de 5µL da suspensão de células e 300µL de solução TEN (EDTA 0,5M, pH 7.0 e 8.0; Tris-base 1M, pH 7.0 e 8.0; NaCl 4M, SIGMA) recebeu o acréscimo de 340µL da agarose, anteriormente preparada. Com o cuidado para não solidificar e nem formar bolhas de ar, os moldes para a formação dos blocos de agarose (BIORAD) foram preenchidos com a mistura e, em seguida, mantidos a 8°C por 15 minutos para a solidificação.

Foram testadas também mais duas variações desta etapa inicial do protocolo de extração (opções 2 e 3). Nestas opções, cada cepa foi obtida através de uma cultura de 24 horas a 37°C em placa de agar nutriente (DIFCO), de onde selecionou-se uma colônia que foi repicada para um tubo contendo 3 mililitros de caldo tripticase de soja ou TSB (OXOID). Os tubos foram incubados a 37° em banho-maria com agitação até atingirem a turvação 2 da escala de McFarland (aproximadamente 4 horas). Este crescimento foi transferido para tubos do tipo “eppendorf” (previamente pesados e identificados), que foram centrifugados por 4 minutos a 8.000 rotações por minuto em temperatura de 4°C. Retirou-se o sobrenadante e cada tubo do tipo “eppendorf” foi pesado novamente. Pela diferença entre os pesos dos “eppendof” com e sem o precipitado (“pellet”), deduziu-se o peso do “pellet”, considerado ideal entre 10 e 20 microgramas. Quando necessário, foi retirado material do tubo do tipo “eppendorf” até a obtenção de um “pellet” nesta faixa de peso. Na opção de protocolo n°2, foi retirada uma alíquota de 5 microlitros deste “pellet”, que foram transferidos para outro tubo do tipo “eppendorf”, previamente identificado e contendo 300 microlitros de solução salina 0,85%. Foi acrescida posteriormente a agarose Low Melting 2% (340 microlitros), sendo realizada a homogeneização e posterior distribuição nos moldes. Na opção de protocolo 3, foram adicionados 200 microlitros de solução salina a 0,85% estéril e 200 microlitros de agarose Low Melting a 2% (à temperatura de 50°C). Esta

mistura foi gentilmente homogeneizada com auxílio de uma micropipeta e uma alíquota distribuída no molde acrílico de blocos para PFGE. A partir deste ponto, utilizou-se o mesmo protocolo.

4.5.2. Extração e purificação do DNA cromossômico

Iniciaram-se, então, os processos de tratamento das células bacterianas, visando a extração e a purificação do DNA cromossomal. Os blocos foram removidos dos moldes e submersos em 2mL de solução EC (EDTA 0,5M, pH 7.0 e 8.0; Tris-base 1M, pH 7.0 e 8.0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Desoxicolato de sódio, SIGMA), dispensados em espaços de placas de microdiluição (6 a 12 espaços), previamente identificados. Em seguida, a placa foi vedada e incubada a 37°C por 12-18 horas, com o objetivo de promover a lise da parede celular bacteriana. No dia seguinte, um bloco de agarose foi retirado da solução anterior e fracionado em três parte iguais, sendo uma das partes mergulhada em 100µL de solução de RNAse (1:500, SIGMA) e incubada em banho-maria a 37°C 12-18 horas. As frações restantes foram devolvidas para a placa de microdiluição. O terceiro dia começou em duas lavagens de 30 minutos com solução-tampão CHEF-TE 1x concentrada (EDTA 0,5M, pH 7.0 e 8.0; Tris-base 1M, pH 7.0 e 8.0, SIGMA), tanto para os blocos em solução EC quanto para o tratado com a solução RNAse. Os primeiros foram mantidos sob refrigeração (4-8°C), mergulhados em solução-tampão CHEF-TE 1x concentrada, trocada periodicamente. A fração já tratada com RNAse foi colocada em tubo do tipo "eppendorf" contendo 1mL de solução ES (EDTA 625mM, pH 9.3; N-lauril sarcosil 5%, SIGMA) acrescido de 0,2mL de Proteinase K (20mg/mL, GIBCO BRL) e incubada a 50-56°C por 48 horas, a fim de lisar completamente a célula e inativar proteínas. Após a aspiração da solução ES, o bloco foi acondicionado em placa de microdiluição nova (6 a 12 espaços) e enxaguado em uma nova série de 4 lavagens com 2mL de solução-tampão CHEF-TE 1x concentrada, com um intervalo de 1 hora entre cada lavagem e, então, armazenado a 5°C até a etapa da digestão. Tomou-se o cuidado de embalar a placa, a fim de evitar a evaporação da solução, garantindo que os blocos pudessem permanecer estocados durante meses, se necessário.

4.5.3. Digestão do DNA cromossômico

4.5.3.1. Seleção da endonucleases de restrição:

Uma primeira análise foi realizada com 6 cepas de *S.* Typhimurium e as enzimas de restrição *Xba*I (30U, Amershan Pharmacia Biotech, England) e *Spe*I (15U, Amershan Pharmacia Biotech, England). Este foi um teste para avaliar qual enzima seria usado no presente estudo. As enzimas foram testadas mantendo-se voltagem (6V); temperatura (14°C); initial swit time (2,2); final swit time (63,8); tempo de corrida (19 h); ângulo (120°); velocidade da bomba (70). Estes parâmetros foram utilizados com base em artigos e no protocolo usado pelo PulseNet (CDC_B, 2004).

4.5.3.2. Etapas da digestão:

A princípio, uma fração foi mergulhada em 300µL de solução DNS (Tris-base 1m, pH 8.0; Cloreto de magnésio 1M, SIGMA), anteriormente pipetada em poços de uma placa de microdiluição (96 espaços). Esta solução foi substituída a cada hora, por 4 vezes (a solução de $MgCl_2$ atua como catalisador enzimático durante a digestão do DNA). Na falta de tempo hábil para a continuidade, o bloco foi mantido nesta solução, a 5°C por 12-18 horas. Depois da remoção da solução DNS, procedeu-se a imersão em 50µL da solução-tampão da endonuclease (*Spe*I, 5µL do tampão:45µL água bidestilada esterilizada/amostra), por um período de 1 hora a 5°C. Em seguida, o bloco foi tratado com a enzima de restrição *Xba*I (30U, Amershan Pharmacia Biotech, England) e estabilizado durante 1 hora a 5°C, antes da incubação por 20 horas a 37°C.

4.5.4. Eletroforese em campo pulsado

O marcador de peso molecular *lambda DNA ladder* 50-1000kbp (SIGMA) foi inserido no gel de agarose do mesmo modo que as cepas de *S.* Typhimurium. Também foi utilizado a cepa padrão *S.* Braenderup H9812 fornecida pelo CDC/EUA e preconizada pelo PulseNet. O gel foi preparado com agarose a 1,0g% em tampão TBE 0.5x concentrado (EDTA; Tris-base; Ácido bórico), e moldado em suporte fornecido pelo fabricante (BIORAD) com, aproximadamente, 100mL da agarose dissolvida. Uma vez aplicadas as amostras e os marcadores de peso molecular,

procedeu-se à preparação do equipamento CHEF DRIII (BIORAD), e à programação das condições de eletroforese, conforme estabelecido anteriormente.

Uma vez finalizada a corrida eletroforética, o gel de agarose foi corado durante 20 minutos com uma solução de brometo de etídio (10µL/100mL) e descorado por 1 hora em água destilada. Os perfis de macrorrestrição gerados foram visualizados e fotografados sob iluminação UV em aparelho "Gel Doc" (Amershan Pharmacia Biotech, England).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação inicial permitiu confirmar as caractarísticas bioquímicas e integridade antigênica das 390 cepas selecionadas da coleção de culturas do Laboratório de Enterobactérias – LABENT/IOC.

Em todas foi realizado o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, confirmando em 311 o perfil anteriormente detectado através de atividade de monitoramento do LABENT e reconhecendo esta característica em 79 cepas isoladas de fontes humana e alimentar incluídas na amostragem e não avaliadas anteriormente.

Através do método de difusão de discos em agar, foram obtidos 72 perfis distintos de resistência (Tabela 1) . Do total, 346 cepas (88,72%) apresentaram resistência a pelo menos um fármaco. Das 44 restantes, 16 foram sensíveis a todas as drogas testadas e 28 apresentaram um perfil exclusivamente intermediário, de acordo com os critérios preconizados pelo CLSI (NCCLS, 2003).

A correlação de acordo com a fonte de isolamento entre resultados obtidos para cada fármaco e o total de cepas resistentes (346) está ilustrada na Tabela 2, onde é possível observar a ocorrência de pelo menos uma resistente em todas as fontes. Entre as 346 cepas, os quatro antimicrobianos que apresentaram os maiores percentuais de resistência foram: tetraciclina (85,84%), nitrofurantoína (67,63%), cloranfenicol (30,93%) e ácido nalidíxico (26,01%). Esta quinolona é considerada marcador de resistência para quinolonas de última geração (SEYFARTH *et al*, 1997). Sua utilização, particularmente as fluoroquinolonas, apresenta importância na clínica humana por ser uma das opções de tratamento de salmoneloses, principalmente em adultos (HOHMANN, 2001; ANGULO *et al*, 2000). Em um estudo com pacientes que apresentavam isolados de *S*. Typhimurium resistentes ao ácido nalidíxico, o tratamento com fluoroquinolonas falhou, sugerindo alguma relação desta falha com a droga precursora (MOLBAK *et al*, 1999). CASIN *et al* (2003) também apontaram o insucesso no tratamento com ciprofloxacina em dois pacientes, sendo a resistência a este fármaco associada a mutações cromossômicas para GyrA (REYNA *et al*, 1995), GyrB e ParC (CASIN *et al*, 2003). A resistência a quinolonas pode estar relacionada ao uso de enrofloxacina (fluoroquinolona) na clínica animal.

No caso da *S*. Typhimurium DT104, entretanto, DAVIS *et al* (2002) acham que a disseminação bem sucedida deste patógeno não se deva ao seu perfil de multirresistência, nem que este esteja atribuído à pressão seletiva antimicrobiana. Corrobando com esta hipótese, um estudo na Bélgica apresentou decréscimo no percentual de isolados resistentes à enrofloxacina de 25% a 0% no período de 1991 a 1998. Este decréscimo foi associado à substituição de uma população de fagotipo 204c resistente a esta droga por uma população DT104 sensível à enrofloxacina., pois não houve redução no uso desta droga no gado (IMBERECHTS *et al*, 2000). O mesmo fenômeno foi observado, ao mesmo tempo, na Alemanha (MALORNY *et al*, 1999). A enrofloxacina tem sido usada como um marcador para a veterinária, cujos resultados quanto ao aumento do percentual de resistência foi observado em *Campylobacter* spp após sua introdução na medicina veterinária (ENDTZ *et al*, 1991).

A distribuição da resistência por ano de isolamento das cepas (Tabela 3) permitiu observar um aumento na resistência ao ácido nalidíxico de 1999 a 2003, passando de 10,14% a 35,59% dos isolados inclusive com associação a outros grupos de antimicrobiano, sem, no entanto, apresentar resistência à ciprofloxacina. O aumento da resistência ao ácido nalidíxico também foi observado na Espanha, no período de 1981 a 2003 (MARIMÓN *et al*, 2004), com concomitante aumento para ciprofloxacina, principalmente em *S*. Hadar e *S*. Enteritidis. Como há indício de uma forte relação entre resistência a esta última droga e certos sorovares de *Salmonella* – *S*. Hadar, *S*. Virchow, *S*. Enteritidis e *S*. Typhimurium DT104 – citada por alguns autores (HAKANEN *et al*, 1999; PRATS *et al*, 2000), talvez seja essa a razão da ausência de resistência a ciprofloxacina nos isolados de *S*. Typhimurium da atual pesquisa. Porém, representa um alerta para que o monitoramento seja uma atividade contínua a fim de surpreender tal ocorrência e as desagradáveis conseqüências.

A resistência a tetraciclina, nitrofurantoína e cloranfenicol tem aumentado durante os cinco anos estudados (Tabela 3), sendo este aumento observado também por outros autores (RODRIGUES, 2000; SEKI, 2000). Já a ampicilina apresentou decréscimo ao longo dos anos nesta avaliação, sendo o oposto do que tem sido relatado nas investigações de CHIAPPINI *et al* (2002), HERNANDEZ *et al* (2002) e EDRINGTON *et al* (2004). Tetraciclina foi usada por muito tempo em suínos, tanto em tratamento como na profilaxia de doenças e a ampicilina para colibacilose em pintos de um dia. A alta incidência de cepas de origem animal resistentes a essas drogas foi

reflexo do uso exacerbado de antimicrobianos na veterinária (SEYFARTH *et al*, 1997). Tetraciclina e nitrofurantoína, usadas em doses subterapêuticas em rações, apresentaram elevadas porcentagens em isolados resistentes de aves (SEKI, 2000)

Na Tabela 2, notamos que 66 cepas (19,08%) apresentaram resistência à ampicilina, 50 (14,45%) a sulfametoxazol-trimetoprim e 43 (12,43%) à gentamicina. As cefalosporinas de primeira (cefalotina), segunda (cefoxitina) e terceira (ceftriaxona) gerações foram representadas por 14 (4,05%), 12 (3,47%) e três (0,87%) cepas que revelaram resistência, respectivamente.

No homem, ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol foram usados por um longo período no tratamento de salmoneloses graves. Entretanto, devido ao aumento dos índices de resistência e falha terapêutica nas infecções determinadas por este gênero, as drogas de escolha atualmente são fluoroquinolonas e cefalosporinas de espectro estendido (ANGULO *et al*, 2000; WINOKUR *et al*, 2000; HOHMANN, 2001). A ceftriaxona é uma droga extremamente importante no tratamento de salmonelas invasivas, particularmente em crianças (MOLBAK *et al*, 1999), tendo em vista que o uso de fuoroquinolonas é contraindicado por determinar efeitos altamente deletérios. À semelhança dos resultados obtidos na presente investigação, a resistência a ceftriaxona em *S.* Typhimurium já havia sido descrita, inclusive em crianças (RABATSKY-EHR *et al*, 2004), onde a transmissão de animais para o homem desta cepa resistente foi apontada por Fey *et al* (FEY *et al*, 2000). Nos EUA, um mecanismo *bla*CMY-2 mediado por um plasmídio tem sido descrito como fonte de resistência a β-lactâmicos de amplo espectro, inclusive à ceftriaxona (DUNNE *et al*, 2000; CARATTOLI *et al*, 2002). A produção de β-lactamases de amplo espectro (ESBL) por *S.* Typhimurium tem sido apontada por diferentes autores, os quais caracterizam uma grande variedade destas enzimas, como SHV-2 (BENREDJEB *et al*, 1988), CTX-M1 (BAUERNFEIND$_B$ *et al*, 1996) CTX-M2 (BAUERNFEIND *et al*, 1992), PER-1 (VAHABOGLU *et al*, 1996), PER-2 (BAUERNFEIND$_A$ *et al*, 1996), LAT-2 (GAZOULI *et al*, 1996), CTX-M4 (GAZOULI *et al*, 1998), CTX-M5 (GAZOULI *et al*, 1998), CTX-M6 (GAZOULI *et al*, 1998) e TEM-3 (AITMHAND *et al*, 2002). No Brasil, há relatos sobre *Salmonella* resistentes a cefalosporinas em diversos ambientes, principalmente o hospitalar (ASENSI & HOFER, 1994; RODRIGUES, 2000; FONSECA, 2003; MULVEY *et al*, 2004).

Somente uma cepa apresentou resistência ao imipenem (0,29%), conforme o ilutrado na Tabela 2. Imipenem é um beta-lactâmico do tipo carbapenema que oferece excelentes resultados no ponto de vista terapêutico por apresentar atividade contra praticamente todos os cocos e bacilos Gram positivos e negativos (TRABULSI *et al*, 2002). A resistência a este fármaco era esperada em isolados nosocomiais, pela pressão antimicrobiana exercida neste meio (ARMAND-LEFEVRE et al, 2003). Entretanto, a presença de cepas resistentes ao imipenem foi observada em alimentos (frangos congelados e resfriados), num estudo na Espanha (HERNANDEZ *et al*, 2002). Na avaliação por nós efetuada, ela foi verificada em uma cepa (Tabela 2) isolada de matéria-prima, a base para a disseminação na cadeia alimentar, e é um alerta, pois esta droga representa um dos recursos mais empregados em nosso meio como única opção terapêutica em pacientes hospitalizados colonizados por microrganismos produtores de β-lactamases de amplo espectro.

Analisando os perfis de resistência obtidos, as 346 cepas foram agrupadas conforme os critérios preconizados pela OMS: de resistência até dois grupos de fármacos e igual ou maior a três grupos de fármacos (multirresistentes). Cento e oitenta e oito (54,33%) cepas se enquadraram no primeiro grupos e 158 (45,67%) foram multirresistentes (Tabela 4).

Das cepas isoladas de alimentos (164), 76 (46,34%) apresentaram-se multirresistentes (Tabela 4). Nas 115 de origem animal, a resistência a fármacos foi observada em 101 cepas, sendo 49 (42,61%) multirresistentes. Das 41 de origem ambiental a multirresistência foi observada em 24,39% e em 34,88% das 43 de matérias-primas. Sete (26,92%) das 22 cepas resistentes isoladas de fonte humana apresentaram perfil multirresistente, não sido detectado perfil exclusivamente de sensibilidade, apresentando, no mínimo, resistência intermediária. A única cepa isolada a partir de controle da qualidade das empresas apresentou perfil de multirresistência. Esta característica se apresentou comum e com porcentagens extremamente elevadas entre os isolados de *S*. Typhimurium na presente investigação, tendo sido observada em todas as fontes e anos. A alta e crescente prevalência de multirresistência já era esperada e está de acordo com outros relatos referentes a este sorvar (LAILLER *et al*, 2002; RABATSKY-EHR *et al*, 2004), sendo provavelmente atribuída à pressão seletiva originada pelo uso indiscriminado de agentes antimicrobianos em humanos, na agricultura e, particularmente para este sorovar, em animais de produção (COHEN &

TAUXE, 1986; GLYNN *et al*, 1998; ANGULO *et al*, 2000; BESSER *et al*, 2000; FEY *et al*, 2000; RODRIGUES, 2000; VAN DER BOGAARD & STOBBERINGH, 2000; DAVIES *et al*, 2002).

No intuito de efetivar o rastreamento na totalidade das 390 cepas utilizadas neste estudo, foi efetuada a técnica de lisotipia, cuja distribuição segundo o fagotipo e fonte de isolamento encontra-se na Tabela 5. Esta técnica permitiu caracterizar 14 fagotipos distintos em 327 cepas, não tendo sido possível tipificar 63 (16,16%) cepas, designadas como não tipificáveis (UT). O termo UT ("untypable") é usado por alguns autores para definir isolados que não reagem com nenhum preparado fágico específico, ofertando perfil incompatível com aqueles reconhecidos (RABATSKY-EHR *et al*, 2004). Este termo foi por nós empregado aos isolados que reagiram com um ou mais fagos sem no entanto apresentarem um perfil de lise compatível com os apresentados por Anderson (ANDERSON *et al*, 1977).

O fagotipo prevalente foi DT193, tendo sido caracterizado em em 281 (72,05%) das 390 cepas analisadas (Tabela 5), em todas as fontes de isolamento e em todas as regiões (Tabela 6), ao longo dos cinco anos contemplados neste estudo (Tabela 7). De acordo com os resultados obtidos na presente investigação, estes expressam a disseminação e a persistência deste fagotipo em todo o território nacional.

Para cada droga analisada, este fagotipo apresentou pelo menos um isolado resistente (Tabela 8) e multirresistência observada em todas as fontes e anos de isolamento (Tabela 7). O fagotipo DT193 tem sido identificado em diversos países, apresentando isolados com multirresistência antimicrobiana (DALY & FANNING, 2000; FRANA *et al*, 2001; LAILLER *et al*, 2002). Este lisotipo é considerado uma derivação de *S*. Typhimurium DT204 que apresenta resistência a cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina pela aquisição de um plasmídio que codifica resistencia adicional a ampicilina e canamicina (THRELFALL *et al*, 1980). Outra versão é que a aquisição de plasmídios (THRELFALL *et al*, 1978) ou bacteriófagos (FROST *et al*, 1982) por um grande número de lisotipos de *S*. Typhimurium não relacionados resultou na conversão ao DT193 (BAQUAR *et al*, 1994), justificando a grande heterogeneidade entre isolados deste fagotipo (BAQUAR *et al*, 1994; HAMPTON *et al*, 1995; RAHMAN, 2002).

Tanto o DT204 quanto o DT193 estiveram internacionalmente disseminados na Europa na década de 70 (THRELFALL *et al*, 1978; ROWE *et al*, 1979), sendo também encontrados na América do Sul (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1974). Um estudo na Itália, no período de 1992 a 1997 (NASTASI & MAMMINA, 2000), também revelou o DT193 como o fagotipo de maior prevalência entre os isolados multirresistentes testados. Na totalidade das investigações anteriormente citadas, sua resistência foi atribuída a plasmídios de diversos pesos moleculares. Aqui no Brasil, a análise de cepas pertencentes a este fagotipo permitiu observar ao longo dos anos que sua multirresistência gradativamente aponta perfil com maior número de drogas, chegando a apresentar resistência a oito drogas no ano de 2002. Este perfi representa um alerta, principalmente quando observamos a resistência a imipenem identificada em um isolado de matéria-prima pertencente a este fagotipo e, das três cepas com resistência a ceftriaxona, duas pertenciam ao lisotipo DT193.

DT193, junto com o DT208, representam 10,9% dos isolados de *S*. Typhimurium pentarresistentes em animais pelo Laboratório Nacional de Serviços veterinários dos EUA em 1998 (FRANA *et al*, 2001). O DT208 é outro fagotipo mundialmente relacionado à multirresistência (FRANA *et al*, 2001) e também foi caracterizado neste estudo (Tabelas 5, 6 e 8). Ele foi observado em 17 cepas (4,36%), em fontes humanas, alimentar e animal e nas regiões sul e sudeste (ROWE *et al*, 1979; RANGNEKAR *et al*, 1983; ROWE & THRELFALL, 1984; SEYFARTH *et al*, 1997; CRUCHAGA *et al*, 2001).

Seis cepas (1,54%) foram caracterizadas como fagotipo 120, encontradas em todas as fontes, com exceção de matéria-prima, todos os anos e regiões, excetuando-se o Nordeste (Tabelas 5, 6 e 8). O DT120 multirresistente é relacionado a *S*. Typhimurium DT104 (LAWSON *et al*, 2002), provavelmente por uma transferência horizontal de genes de resistência (BRIGGS & FRATAMICO, 1999; LAWSON *et al*, 2002). Entretanto, somente uma das cepas deste fagotipo oriunda de alimento apresentou multirresistência no presente estudo.

O lisotipo 10 também foi caracterizado em seis cepas (Tabelas 5, 6 e 8) todas isoladas de alimentos, em 1999 e da região sudeste, provavelmente resultantes da mesma amostragem. Todos os isolados eram multirresistentes, apresentando resistência a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina e nitrofurantoína (exceto uma cepa, que só

apresentou resistência às três primeiras drogas). Este fagotipo esteve disseminado no Canadá de 1970 a 1979, embora 90% dos isolados se apresentassem sensíveis a todos os antimicrobianos testados (KHAKHRIA *et al*, 1983). Todavia, ainda neste país, o mesmo fagotipo foi responsável por um surto alimentar em 1984, com mais de 2.000 casos confirmados (BEZANSON *et al*, 1985).

O fagotipo 18 foi caracterizado em cinco cepas (1,28%), mas somente em duas fontes (alimento e animal) e regiões (sul e sudeste). Entre os outros fagotipos encontrados ressalta-se a caracterização do fagotipo 204 em uma cepa (Tabelas 5, 6 e 8). Este foi descrito na década de 70 tendo sido considerado epidêmico e multirresistente, porém, neste estudo, verificamos que se apresentou como caso único e com resistência somente à tetraciclina. Aponta-se ainda que um dos isolados do fagotipo 171 apresentou resistência às três cefalosporinas estudadas e a multirresistência do fagotipo 89 (AMP, CHL, TCY, CEP, GEN, NAL, SXT, NIT).

Entretanto, a maior relevância observada na presente investigação é da caracterização de uma cepa pertencente ao fagotipo 104L, isolada de fonte animal (ave), na região Centro-Oeste em 2001. Esta apresentou resistência a ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico e nitrofurantoína, sendo o primeiro relato de uma cepa de *Salmonella* Typhimurium DT104 no Brasil. O perfil de multirresistência deste isolado condiz com o apresentado em outras partes do mundo (ABOUZEED *et al*, 2000; BAGGESEN *et al*, 2000; THRELFALL, 2000; MALORNY *et al*, 2001; MURPHY *et al*, 2001; REFSUM *et al*, 2002; GORMAN & ADLEY, 2004).

Este sorovar tem sua resistência associada a integrons cromossômicos sendo a aquisição de resistência resultado de mutações cromossômicas. A resistência cromossômica foi confirmada através de um estudo utilizando a técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR), onde foi revelada a presença de dois integrons, que aparecem no gel como duas bandas de aproximadamente 1,0 e 1,2 Kb. Neste último trabalho, todos os isolados DT104 ACSSuT apresentavam os mesmo cassetes de genes, independente da fonte de isolamento ser humana ou de animais de produção. Os integrons parecem atuar como locais de inserção (recombinação sítio-específica) de genes de resistência ou grupo destes e são encontrados no ácido desoxirribonucléico (DNA) cromossômico ou extracromossômico (THRELFALL *et al*, 1994; FROST *et al*, 1995; THRELFALL$_A$ *et al*, 1996; THRELFALL$_B$ *et al*, 1996; RIDLEY &

THRELFALL, 1998; SANDVANG *et al*, 1998; BRIGGS & FRATAMICO, 1999; HUMPHREY, 2001). Ademais, foi detectada a transferência horizontal de genes de *S.* Typhimurium DT104 para outros fagotipos, como o 120 (LAWSON *et al*, 2002; BOYD *et al*, 2001), ou sorovares, como *S.* Agona (CLOECKAERT *et al*, 2000), *S.* Muenchen (GEBREYES & THAKUR, 2005), *S.* Infantis, *S.* Derby, entre outros (LEVINGS *et al*, 2005). Este aspecto representa um grande risco sob o ponto de vista de Saúde Pública, dado seu potencial epidêmico e capacidade de transferência de sua multirresistência para outros isolados de nosso território, sendo que esta é reconhecida como cromossômica, distinta do DT193, prevalente no Brasil, no qual é usualmente plasmidial.

Das 158 cepas multirresistentes encontradas neste estudo, apenas uma apresentou o fagotipo DT104. Este resultado indica que a multirresistência (que neste estudo foi relacionada principalmente ao fagotipo DT193) em isolados de *S.* Typhimurium apresenta também outra fonte que não o DT 104, em acordo com o observado por Yang *et al* (YANG *et al*, 2002).

Das cepas que apresentavam resistência, foi selecionado um percentual de aproximadamente 30% (28,6%), contabilizando 99 cepas. Este total foi submetido à análise do perfil plasmidial. Foram obtidos 28 perfis plasmidiais distintos (Tabela 9), sendo que em 29 amostras não houve êxito na detecção de plasmídios. Bandas de plasmídios que diferiam em até 5% no peso molecular (calculado em MDa e em kb) foram consideradas indistintas, segundo critério adotado por Seyfarth (SEYFARTH *et al*, 1997). Foram observados 21 pesos moleculares diferentes nos 28 perfis, variando de 1,51 a 203,9 kb. Alguns dos géis obtidos estão ilustrados nas Figuras 1 e 2.

Uma cepa padrão de *S.* Typhimurium DT104 (Danish Veterinary Institute/Dinamarca), com perfil ACSSuT bem definido, foi usada como um “padrão de comparação” com a cepa DT104 identificada no presente estudo. Este dado não foi compilado nas tabelas e quadros destes resultados. Esta cepa padrão apresentou o perfil plasmidial “p12” (um único plasmídio de 143,5 kb). Trinta e duas cepas apresentaram no seu perfil plasmidial um plasmídio de 143,5 kb, representando 32,33% dos isolados. Este plasmídio foi o único encontrado em todas as fontes de isolamento (Tabela 9), estando presente em cepas pertencentes aos fagotipos DT193, 10, 29, DT208 e 129 (Tabela 10), além da DT104 padrão e três cepas não tipificáveis (UT). O isolado DT104

deste estudo (“brasileiro”) apresentou o perfil “p18”, constituído de um plasmídio de aproximadamente 135,9 kb. Um plasmídio de 151 kb também revelou ampla disseminação entre os isolados, sendo encontrado em 19 cepas, de origem animal, alimentar e humana.

O perfil plasmidial mais comum foi o “p12” (um único plasmídio de 143,5 kb), sendo observado em 19 cepas (Tabela 9). Em seguida, perfis “p3” (151 kb), “p1” (188,8 kb), e “p13” (143,5 e 135,9 kb), com 11, cinco e quatro cepas, respectivamente. O plasmídio de virulência específico para *S*. Typhimurium citado na literatura (95 kb) não foi encontrado (SEYFARTH *et al*, 1997; LOW *et al*, 1997). Entretanto, foram observados plasmídios de pesos moleculares próximos, como 98,2 e 90,6 kb. Estes dois últimos plasmídios foram observados em uma cepa de origem humana e com multirresistência (perfil TCY, NAL, NIT). Todos os perfis plasmidiais apresentaram isolados com multirresistência (Tabela 11), com exceção dos perfis “p5”, “p6”, “p7”, “p22” e “p26”. A multirresistência também estava presente em isolados onde plasmídios não foram detectados. Os perfis “p3” e “p12” apresentaram no mínimo um isolado com resistência para cada antimicrobiano, com exceção ao imipenem para “p12” e imipenem e ceftriaxona para “p3”. O único isolado que apresentou resistência ao imipenem não teve nenhum plasmídio detectado e todas as três cepas resistentes à ceftriaxona apresentaram plasmídios que variaram bastante em relação ao seu peso molecular (143,5; 37,8; 30,2 e 22,7). Na literatura, os plasmídios que carreiam resistência à ceftriaxona (mediada por CMY-2) apresentaram pesos moleculares variando de 60 a 75 kb (CARATTOLI *et al*, 2002). AITMHAND *et al* (2002) encontraram um plasmídio de 10 kb codificando resistência para TEM-3 e GAZOULI *et al* (1998) um de 12 kb para uma CTXase. Nenhum dos plasmídios citados na literatura corresponde, em peso, aos encontrados nos isolados resistentes a este antimicrobiano no presente estudo.

Tomando por base os resultados auferidos quanto a resistência aos antimicrobianos isoladamente ou em seu conjunto e a análise do perfil plasmidial, não foi encontrada nenhuma associação. Mesmo os plasmídios mais frequentes (como o de 143,5 kb e o de 151 kb) não puderam ser associados à resistência. Embora esta técnica tenha sido muito utilizada dessa forma no passado e nele tenha fornecido as respostas para perguntas epidemiológicas e caracterização de resistência (BRUNNER *et al*, 1983; THRELFALL$_B$ *et al*, 1990), ela não foi eficiente para os mesmos propósitos na presente

investigação. Todavia, a resistência mediada por plasmídios tem sido relata em diversas publicações, inclusive a drogas utilizadas no tratamento clínico de salmoneloses graves, como a ceftriaxona (DUNNE *et al*, 2000). Sendo assim, o material extra-cromossômico deste patógeno apresenta extremo valor epidemiológico, devendo ser analisado em casos de resistência a antimicrobianos. Como a resistência a antimicrobianos pode estar associada a diversos e diferentes tipos de mecanismos, são necessárias técnicas mais específicas para genes de resistência, como pesquisa por PCR, transferência para membrana para hibridização com sondas, enzimas de restrição, entre outras (SCHUMAN *et al*, 1989; MILLEMANN *et al*, 1995; MOHAN *et al*, 1995). Para resolver este impasse, sugere-se que a análise do perfil plasmidial seja associada a uma destas técnicas. Esta sugestão já foi feita por outros autores (SCHIAFFINO *et al*, 1996; TENOVER *et al*, 1997; LINDQVIST *et al*, 1999).

Para o PFGE, na presente investigação, foi empregada uma amostragem constituída de 13 cepas de origem humana (Tabela 12). Deu-se preferência às cepas multirresistentes e que apresentassem fagotipos distintos. Em uma primeira etapa, foram reconhecidos diferentes protocolos para avaliação deste sorovar. A partir daí, foram testadas três variações de preparo de blocos de agarose. Na primeira opção, foram utilizadas as seguintes variáveis: crescimento bacteriano de aproximadamente 18 horas, agitação por vórtex, duas centrifugações (15 min/3.000 G/4°C e 30 s/12.000 G/4°C), 340 μL de agarose Low Melting Point a 2% e 5 μL de suspensão ("pellet" em solução salina 0,85% no volume igual ao peso do "pellet"), tampão TEN. A segunda e a terceira opções foram bem semelhantes: ambas utilizavam uma cultura bacteriana de aproximadamente 4 horas com turvação 2 da escala de McFarland, 200 μL de solução salina a 0,85%, 200 μL de agarose Low Melting Point a 2% e somente uma centrifugação (4 min/8.000 G/4°C). A diferença entre elas é que a opção 2 usava uma alíquota de 5 μL do total do "pellet" e a opção 3 o utilizava todo. As duas últimas opções foram testadas visando a manutenção da integridade da célula e do DNA bacterianos, através da redução das agressões físicas (vórtex) e químicas (tampão TEN, com alta osmolaridade) e da utilização de um crescimento bacteriano que não estivesse na fase de declínio (como o crescimento em 18 horas provavelmente estaria). Em relação ao teste das enzimas, tanto *Xba*I quanto *Spe*I apresentaram bons resultados, sendo ambas consideradas adequadas ao sorovar Typhimurium. Entretanto, *Spe*I apresentou um maior número de bandas (Figura 3), oferecendo maior discriminação entre os isolados. Ela seria a enzima escolhida mas, por dificuldades encontradas em

relação a sua importação junto ao Ministério da Agricultura, optou-se por utilizar a *Xba*I.

Como podemos observar na Figura 4, os isolados que foram submetidos à opção de protocolo 1 apresentam seu material cromossômico degradado, figurando como um “rastro”, sem a visualização de bandas. Já com as opções 2 e 3, a visualização de bandas foi possível. Os isolados submetidos à opção 3 apresentaram bandas mais definidas, tendo sido esta a opção adotada.

Os isolados humanos utilizados na avaliação pelo PFGE estão apresentados na Tabela 12. Analisando a Figura 5, foi possível identificar 7 perfis de macrorrestrição, segundo os critérios preconizados por Tenover (TENOVER *et al*, 1995). Na análise dos perfis gerados por PFGE, cepas diferindo em uma ou duas bandas foram consideradas com relação clonal (TENOVER *et al*, 1995; MASLOW *et al*, 1993). O isolado H13 não apresentou um perfil de bandas nítido, impossibilitando sua comparação fidedigna com os demais. Dessa forma, este isolado não entrou na análise dos perfis obtidos.

O perfil 1 agrupou os isolados H2, H3 e H5, que foram considerados indistintos. Interessante notar que os três isolados pertencem a regiões geográficas diferentes, sendo que duas extremamente distantes: o H2 isolado na região Sul e o isolado H5 no Nordeste brasileiro. Todos apresentavam o fagotipo DT193 e perfil de multirresistência, embora estes últimos sejam diferentes entre os isolados. Todavia, o perfil 1 apresentou quatro drogas em comum (CHL, TCY, NAL, NIT). Os isolados H1, H4 e H7 foram agrupados no perfil 2 (também indistinguíveis). Todos pertencem à região Sul e apresentam o fagotipo DT193. Os perfis de resistência são distintos, mas todas as três cepas são multirresistentes e apresentam resistência a tetraciclina e nitrofurantoína. O perfil 3 apresentou dois isolados, H6 e H8 (indistintos). Curiosamente, não demonstraram nenhuma semelhança nos critérios analisados (ano, fagotipo, região e perfil de resistência). Só apresentaram em comum a resistência a tetraciclina. Os perfis 4 a 7 apresentaram um isolado, cada um.

Comparando os perfis entre si, observamos que P1, P2 e P3 diferem em três bandas, sendo considerados altamente relacionados e constituindo um único clone neste gel, de acordo com os critérios de Tenover (TENOVER *et al*, 1995). O perfil P3

apresenta estreita relação com o P4, sendo de duas bandas a diferença entre eles. Entretanto, apresentam três fagotipos distintos (DT193 e DT208 no P3 e 179 no P4), três regiões distintas (Sul e Sudeste no P3 e Nordeste no P4) e dois anos diferentes (2002 e 1999 no P3 e 2002 no P4). O P3 ainda apresenta relação com P6 e P7 (diferindo em três bandas com cada perfil).

Comparando os isolados de fagotipo DT193 conforme o ano de isolamento, observamos em 1999 dois isolados (H1 e H2) multirresistentes com a mesma região geográfica (Sul) e considerados clones neste gel. Em 2000, observamos isolados ainda constituindo um mesmo clone multirresistente, entretanto apresentando disseminação em outras regiões (Centro-oeste, Sul, Nordeste). Em 2002, foram observados dois isolados de fagotipo DT193, altamente relacionados pelo perfil de PFGE, mas que apresentavam regiões geográficas polarizadas (Sul e Norte) e perfil de resistência bem diferentes (o isolado H6 é resistente a sete drogas, enquanto o H12 somente a duas). Comparando este dado com os isolados de 1999, podemos sugerir que cepas pertencentes a este fagotipo sofreram alterações no seu genoma ao longo dos anos.

A clonalidade entre os isolados de origem humana nesta pesquisa pode ser sugerida, embora seja necessário um número bem superior de amostras para avaliarmos esta característica. Mesmo sendo de anos, regiões geográficas e fagotipos diferentes, apresentaram perfis altamente relacionados. Em outros países, entretanto, autores revelam uma heterogeneidade entre os perfis obtidos para este fagotipo (CORBETT-FEENEY & RIAIN, 1998; LAILLER et al, 2002).

A disseminação de cepas de *S.* Typhimurium multirresistentes é apontada no mundo todo como um problema de Saúde Pública (THRELFALL, 2000; DAVIS *et al*, 2002). Infecções zoonóticas por este patógeno resultaram em grande número de enfermos e, em alguns casos, em óbitos (MOLBAK *et al*, 1999). Ademais, sua veiculação através da cadeia alimentar tem sido comprovada em diversos estudos (CASIN *et al*, 1999; MIKO *et al*, 2005), inclusive por frangos (WALL *et al*, 1994).

A caracterização do primeiro isolado de DT104 no Brasil é um marco. A veiculação deste patógeno para humanos através da cadeia alimentar já tem sido descrita (WALL et al, 1994), aparentando uma predileção para causar doença grave

(ELLIS et al, 1983; ROEDER et al, 1987; WALL et al, 1994; EVANS & DAVIES, 1996; MILLER, 1997). De fato, infecções causadas por cepas deste fagotipo podem ser difíceis de serem tratadas, devido a gama de antimicrobianos para os quais elas podem apresentar resistência (TSEN et al, 2000; CRUCHAGA et al, 2001; ESAKI et al, 2004; RABATSKY-EHR et al, 2004).

A infecção humana por DT104 já foi associada com o consumo de frango (WALL et al, 1994) e o isolado do atual estudo foi originário de uma ave! Entretanto, aqui no Brasil, a RDC 12/01 (Regulamento sobre controle microbiológico de alimentos) não contempla a pesquisa de Salmonella em carnes congeladas, resfriadas e *in natura* de aves, assim como seus miúdos e suas carnes cruas preparadas. Isso representa um retrocesso na segurança alimentar brasileira, onde a detecção de um patógeno tão importante é omitida e, consequentemente, não rastreada.

A RDC 13/01, a respeito da rotulagem destes produtos anteriormente citados, considera "...a presença de Salmonella em carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados existe de forma crítica, e é um problema mundial, que não existe medidas efetivas de controle que possam eliminá-la da carne crua". Contestando esta afirmativa, são citados os exemplos da Suécia e da Noruega, onde o monitoramento rotineiro associado com intervenções adequadas resultaram na redução significante da incidência de salmoneloses em animais de produção (SWEDISH ZOONOSIS CENTER, 1999; NORWEGIAN ZOONOSIS CENTRE, 2000). Ademais, aqui no Brasil, todas as empresas produtoras de alimentos são obrigadas por lei (tanto pelo Ministério da Saúde quanto pelo da Agricultura) a apresentarem APPCC e BPF implementadas. Estas duas ferramentas têm como objetivo a prevenção de possíveis riscos à saúde do consumidor e, tendo em vista a importância deste patógeno, deveriam contemplar de forma eficiente o controle e o monitoramento de Salmonella.

Outra consideração é a comparação com "...outros países como, Estados Unidos da América, já adotam em suas legislações medidas equivalentes de informações sobre o risco de contaminação de *Salmonella* sp em rotulagem de carne de aves". De fato, a informação adequada sobre os possíveis riscos à saúde é um direito do consumidor e obrigação do fornecedor, de acordo com a Lei 8078/90 (Código de Defesa do Consumidor). Todavia, se a informação é transmitida exclusivamente pelo rótulo impresso, uma parcela da população é excluída deste acesso ao conhecimento dos

possíveis riscos associados. Citando a Constituição Federal de 1988, a saúde é um direito de todo cidadão e deve ser assegurada pelo Estado. Ora, deficientes visuais e analfabetos encontram-se marginalizados no acesso à informação, devido a impossibilidade de leitura do rótulo. Obviamente, sua saúde fica exposta a um risco que não é monitorado pelo Estado, quando este último deveria criar mecanismos para assegurar sua integridade. Sob esta óptica, as RDCs 12/01 e 13/01 estão conflitantes com uma legislação hierarquicamente superior, a Constituição, na qual a qualidade de vida da população é soberana. Cortes e carcaças de frango têm sido comercializadas a granel em supermercados sem a devida rotulagem, do mesmo modo que em feiras livres. Outro aspecto relevante é que a rotulagem obrigatória não deveria isentar a pesquisa de patógenos nos produtos, pois esta atividade representa um monitoramento que permite reconhecer a flutuação de patógenos e atua como um alerta para ações de interveniência da Vigilância (BRASIL, 1988; $BRASIL_B$, 1990; $BRASIL_A$, 2001; $BRASIL_B$, 2001).

Como assegurar que o consumidor não realiza contaminação cruzada entre o alimento e utensílio e/ou recipientes e/ou outros alimentos? Como assegurar que não representa risco o hábito muito comum entre algumas donas de casa de “provar o tempero”? Será que podemos assegurar que domesticamente existem “Boas Práticas de Manipulação”? Essa discussão é finalizada com mais um questionamento: o Estado e os produtores/fabricantes têm o direito de transferir este risco para o consumidor?

Tabela 1: Distribuição dos perfis de resistência aos antimicrobianos em cepas de *S.* Typhimurium de acordo com ano de isolamento.

Perfil de Resistência	ANO					
	1999	2000	2001	2002	2003	Total
AMP	1					1
CEP					1	1
FOX			2			2
GEN		3				3
NAL	1					1
NIT	11		4	7		22
TCY	8	3	7	7	15	40
AMP, GEN	1					1
AMP, NIT	1			1		2
AMP, TCY		4		1	2	7
CHL, NAL					2	2
CHL, SXT	1				1	2
CHL, TCY		1	1	4	5	11
FOX, SXT			1			1
NAL, NIT		1			1	2
NAL, SXT					1	1
TCY, GEN	1				3	4
TCY, NAL	2		1		3	6
TCY, NIT	12	9	31	22	2	76
TCY, SXT	2				1	3
AMP, CHL, TCY	2					2
AMP, NAL, NIT		1				1
AMP, TCY, NIT		3		2	1	6
CEP, FOX, CRO			1			1
CEP, NAL, NIT			1			1
CHL, CEP, NIT			1			1
CHL, GEN, NAL					1	1
CHL, SXT, NIT	1	1				2
CHL, TCY, GEN					2	2
CHL, TCY, NAL				1	2	3
CHL, TCY, NIT				2	1	3
CHL, TCY, SXT	1					1
TCY, CEP, FOX			1			1
TCY, CEP, NIT				2		2
TCY, GEN, NAL				1	1	2
TCY, GEN, NIT	4	1	1			6
TCY, NAL, NIT	3	4	5	16	2	30
TCY, SXT, NIT	1	1				2

AMP: Ampicilina; CEP: Cefalotina; CHL: Cloranfenicol; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; NAL: Ácido Nalidíxico; NIT: Nitrofurantoína; TCY: Tetraciclina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprim.

Tabela 1: Distribuição dos perfis de resistência aos antimicrobianos em cepas de *S.* Typhimurium de acordo com ano de isolamento (Continuação).

Perfil de Resistência	ANO					
	1999	2000	2001	2002	2003	Total
AMP, CHL, TCY, FOX			1			1
AMP, CHL, TCY, GEN		1	1		2	4
AMP, CHL, TCY, NIT	8	1	3			12
AMP, CHL, TCY, SXT		1	2			3
AMP, TCY, CEP, FOX			1			1
AMP, TCY, GEN, NIT		1	1			2
AMP, TCY, NAL, NIT			2			2
CHL, GEN, NAL, NIT				1		1
CHL, TCY, GEN, NAL					1	1
CHL, TCY, GEN, NIT	4			1		5
CHL, TCY, NAL, NIT		2	1	8		11
CHL, TCY, NAL, SXT					1	1
CHL, TCY, SXT, NIT	1	3	2	3	2	11
TCY, CEP, FOX, CRO			1			1
TCY, GEN, NAL, NIT		1	1		1	3
TCY, GEN, SXT, NIT	1					1
TCY, NAL, SXT, NIT				3		3
AMP, CHL, TCY, CEP, NIT				1		1
AMP, CHL, TCY, FOX, NIT		1				1
AMP, CHL, TCY, GEN, NIT				1		1
AMP, CHL, TCY, NAL, NIT	1	1	1		1	4
AMP, CHL, TCY, NAL, SXT					1	1
AMP, CHL, TCY, SXT, NIT		3		1		4
AMP, TCY, CEP, SXT, NIT	1					1
AMP, TCY, NAL, SXT, NIT			1			1
CHL, TCY, NAL, SXT, NIT		1		3		4
AMP, CHL, TCY, GEN, NAL, NIT				1		1
AMP, CHL, TCY, NAL, SXT, NIT		1	1			2
CHL, TCY, FOX, CRO, SXT, NIT		1				1
CHL, TCY, GEN, NAL, SXT, NIT					3	3
AMP, CHL, TCY, CEP, FOX, GEN, NIT			1			1
AMP, CHL, TCY, CEP, FOX, IPM, NIT			1			1
AMP, CHL, TCY, CEP, NAL, SXT, NIT				1		1
AMP, CHL, TCY, CEP, GEN, NAL, SXT, NIT				1		1
Sensíveis	2	1	9	4		16
Resistência intermediária	5	4	8	7	4	28
TOTAL	76	55	95	101	63	390

AMP: Ampicilina; CEP: Cefalotina; CHL: Cloranfenicol; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; NAL: Ácido Nalidíxico; NIT: Nitrofurantoína; TCY: Tetraciclina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprim.

Tabela 2: Freqüência e distribuição dos marcos de resistência em *S*. Typhimurium de acordo com a fonte de isolamento.

Droga	Total	Sigla	% de resistência (n=346)	Fontes					
				HU	AL	A	MP	CQ	AB
Ampicilina	66	AMP	19,08 %	3	27	25	6		5
Cloranfenicol	107	CHL	30,93 %	6	57	29	10	1	4
Tetraciclina	297	TCY	85,84 %	22	132	89	34	1	19
Cefalotina	14	CEP	4,05 %	1	2	3	2		6
Cefoxitina	12	FOX	3,47 %	1	1	2	2		6
Ceftriaxona	3	CRO	0,87 %				1		2
Gentamicina	43	GEN	12,43 %	1	18	13	7		4
Imipenem	1	IPM	0,29 %				1		
Ácido Nalidíxico	90	NAL	26,01 %	5	50	27	5	1	2
Sulfametoxazol-Trimetoprim	50	SXT	14,45 %	4	22	13	9		2
Nitrofurantoína	234	NIT	67,63 %	18	98	70	28		20

A: Animal; AB: Ambiental; AL: Alimentos; HU: Humana; MP: Matéria-prima; CQ: Controle da Qualidade.

Tabela 3: Freqüência e distribuição dos marcos de resistência em *S*. Typhimurium de acordo com o ano de isolamento.

DROGA	Sigla	ANO									
		1999 (n=69)		2000 (n=50)		2001 (n=78)		2002 (n=90)		2003 (n=59)	
		T	%	T	%	T	%	T	%	T	%
Ampicilina	AMP	15	21,74	18	36,00	16	20,51	10	11,11	7	11,86
Cloranfenicol	CHL	19	27,54	18	36,00	16	20,51	29	32,22	25	42,37
Tetraciclina	TCY	52	75,36	44	88,00	68	87,18	81	90,00	52	88,14
Cefalotina	CEP	1	1,45	-	0,00	8	10,26	4	4,44	1	1,69
Cefoxitina	FOX	-	0,00	2	4,00	10	12,82	-	0,00	-	0,00
Ceftriaxona	CRO	-	0,00	1	2,00	2	2,56	-	0,00	-	0,00
Gentamicina	GEN	11	15,94	7	14,00	5	6,41	6	6,67	14	23,73
Imipenem	IPM	-	0,00	-	0,00	1	1,28	-	0,00	-	0,00
Ácido Nalidíxico	NAL	7	10,14	12	24,00	14	17,95	36	40,00	21	35,59
Sulfametoxazol-Trimetoprim	SXT	9	13,04	12	24,00	7	8,97	12	13,33	10	16,95
Nitrofurantoína	NIT	49	71,01	37	74,00	58	74,36	76	84,44	14	23,73

T= Total de cepas resistentes para este antimicrobiano no ano
%= Porcentagem de cepas resistentes a este antimicrobiano em relação ao total de cepas resistentes aos diversos antimicrobianos no ano.
n= Total de cepas que apresentaram resistência aos diversos antimicrobianos no ano.

Tabela 4: Distribuição númerica da resistência das cepas nas diferentes classes de antimicrobianos entre os isolados de *S*. Typhimurium de acordo com o ano e fonte de isolamento.

	Resistência às classes de drogas												
	≤ a 2 (n=188)						≥ a 3 (multirresistentes) (n=158)						
Ano/Fonte	HU	AL	A	MP	CQ	AB	HU	AL	A	MP	CQ	AB	Total
1999	2	22	8	9	-	-	2	16	6	4	-	-	69
2000	-	5	9	1	-	6	2	5	16	4	-	2	50
2001	2	13	19	4	-	9	-	7	13	4	-	7	78
2002	8	12	8	9	-	5	3	32	9	2	1	1	90
2003	3	25	8	-	-	1	-	16	5	1	-	-	59
Total	15	77	52	23	-	21	7	76	49	15	1	10	346

HU: Humana; AL: Alimentos; A: Animal; MP: Matéria-prima; CQ: Controle da Qualidade; AB: Ambiental.

Tabela 5: Correlação da fonte de isolamento com o fagotipo de *S*. Typhimurium.

	Fonte						
PT	Humana (n=26)	Alimentos (n=164)	Animal (n=115)	Matéria-prima (n=43)	Controle da qualidade (n=1)	Ambiental (n=41)	Total (n=390)
10		6					6
18		3	2				5
22				1			1
28		1					1
29	1	1					2
89				1			1
120	1	3	1			1	6
129						1	1
171		1				2	3
179	1						1
193	17	110	83	37	1	33	281
204			1				1
208	1	9	7				17
104			1				1
UT	5	30	20	4		4	63

PT= Fagotipos

Tabela 6: Distribuição e freqüência dos fagotipos de *S*. Typhimurium nas diferentes regiões geográficas do país.

	Região					
PT	Centro-oeste (n=43)	Nordeste (n=4)	Norte (n=11)	Sudeste (n=111)	Sul (n=221)	Total (n=390)
10				6		6
18				2	3	5
22					1	1
28				1		1
29					2	2
89					1	1
120	1		1	2	2	6
129				1		1
171	1			2		3
179		1				1
193	22	1	9	79	170	281
204					1	1
208				8	9	17
104	1					1
UT	18	2	1	10	32	63

PT= Fagotipo

Tabela 7: Perfis de resistência entre isolados de *S*. Typhimurium DT193 de acordo com o ano de isolamento.

FONTE	ANO				
	1999	2000	2001	2002	2003
Humana	TCY, SXT	CHL, TCY, NAL, NIT		AMP, CHL, TCY, CEP, NAL, SXT, NIT	TCY, NIT (2)
	TCY, NAL, NIT	AMP, CHL, TCY, FOX, NIT		CHL, TCY, NAL, SXT, NIT	TCY
	AMP, CHL, TCY, NAL, NIT			CHL, TCY, SXT, NIT	
				TCY, NIT (4)	
Alimentos	AMP, CHL, TCY, NIT (3)	AMP, CHL, TCY, GEN	AMP, CHL, TCY, FOX	AMP, CHL, TCY, GEN, NAL, NIT	AMP, CHL, TCY, GEN
	AMP, NIT	AMP, CHL, TCY, SXT, NIT	AMP, CHL, TCY, SXT	AMP, TCY	AMP, TCY, NIT
	AMP, TCY, CEP, SXT, NIT	AMP, TCY	CHL, TCY, NAL, NIT	CHL, TCY (2)	CHL, GEN, NAL
	CHL, SXT	AMP, TCY, NIT	CHL, TCY, SXT, NIT	CHL, TCY, NAL, NIT (7)	CHL, TCY (3)
	CHL, SXT, NIT	TCY	TCY	CHL, TCY, NIT	CHL, TCY, GEN
	CHL, TCY, SXT	TCY, NAL, NIT	TCY, GEN, NAL, NIT	CHL, TCY, SXT, NIT (2)	CHL, TCY, GEN, NAL, SXT, NIT (2)
	NAL	TCY, NIT (3)	TCY, NAL	NIT (1)	CHL, TCY, NAL
	NIT (3)		TCY, NAL, NIT	TCY, GEN, NAL	CHL, TCY, NAL, SXT
	TCY (4)		TCY, NIT (9)	TCY, NAL, NIT (10)	CHL, TCY, NIT
	TCY, GEN, NIT (2)			TCY, NAL, SXT, NIT	CHL, TCY, SXT, NIT (2)
	TCY, NAL (2)			TCY, NIT (4)	NAL, NIT
	TCY, NAL (5)				TCY (3)
					TCY, GEN
					TCY, GEN, NAL
					TCY, NAL, NIT (2)

Tabela 7: Perfis de resistência entre isolados de *S*. Typhimurium DT193 de acordo com o ano de isolamento (continuação).

FONTE	ANO				
	1999	2000	2001	2002	2003
Animal	AMP	AMP, CHL, TCY, NIT	AMP, CHL, TCY, NAL, SXT, NIT	AMP, CHL, TCY, CEP, NIT	AMP, CHL, TCY, GEN
	AMP, CHL, TCY	AMP, CHL, TCY, SXT	AMP, TCY, NAL, NIT (2)	AMP, CHL, TCY, SXT, NIT	CHL, TCY, GEN
	AMP, GEN	AMP, CHL, TCY, SXT, NIT	AMP, TCY, NAL, SXT, NIT	AMP, TCY, NIT	CHL, TCY, GEN, NAL
	NIT (2)	AMP, NAL, NIT	CHL, TCY, SXT, NIT	TCY (3)	CHL, TCY, NAL
	TCY, GEN, NIT	AMP, TCY (2)	TCY (1)	TCY, CEP, NIT	TCY (2)
	TCY, NAL, NIT (2)	AMP, TCY, GEN, NIT	TCY, NAL, NIT (2)	TCY, NAL, NIT (3)	TCY, GEN (2)
	TCY, NIT	AMP, TCY, NIT	TCY, NIT (11)	TCY, NIT (3)	TCY, GEN, NAL, NIT
	TCY, SXT, NIT	CHL, TCY			TCY, NAL (2)
		CHL, TCY, NAL, NIT			
		CHL, TCY, NAL, SXT, NIT			
		CHL, TCY, SXT, NIT (3)			
		GEN			
		NAL, NIT			
		TCY (1)			
		TCY, GEN, NAL, NIT			
		TCY, NAL, NIT (2)			
		TCY, NIT (2)			
		TCY, SXT, NIT			

Tabela 7: Perfis de resistência entre isolados de *S*. Typhimurium DT193 de acordo com o ano de isolamento (continuação).

FONTE		ANO				
		1999	2000	2001	2002	2003
Controle de Qualidade	Matéria-prima	CHL, TCY, GEN, NIT (2)	AMP, TCY	TCY, GEN, NIT	CHL, TCY, NAL, SXT, NIT	AMP, CHL, TCY, NAL, SXT
		NIT (2)	CHL, SXT, NIT	AMP, CHL, TCY, CEP, FOX, IPM, NIT	TCY (4)	
		TCY	AMP, CHL, TCY, NAL, SXT, NIT	TCY	TCY, NIT (4)	
		TCY, GEN, NIT	TCY, GEN, NIT	TCY, NIT (1)		
		TCY, GEN, SXT, NIT	CHL, TCY, FOX, CRO, SXT, NIT	TCY, NAL, NIT		
		TCY, NIT (5)		AMP, CHL, TCY, SXT		
		TCY, SXT				
					CHL, TCY, NAL	
	Ambiental		AMP, TCY, NIT	AMP, TCY, CEP, FOX	NIT (2)	CHL, SXT
			GEN (1)	AMP, TCY, GEN, NIT	TCY, NIT	
			TCY, NAL, NIT	CEP, FOX, CRO		
			TCY, NIT (4)	CEP, NAL, NIT		
				CHL, CEP, NIT		
				CHL, TCY		
				NIT		
				TCY		
				TCY, CEP, FOX		
				TCY, NIT (4)		

Tabela 8: Distribuição e freqüência dos marcos de resistência em *S*. Typhimurium de acordo com o fagotipo.

Droga	Sigla	Fagotipo														
		10 n=6	18 n=5	22 n=1	28 n=1	29 n=2	89 n=1	120 n=6	129 n=1	171 n=3	179 n=1	193 n=281	204 n=1	208 n=17	104 n=1	UT n=63
Ampicilina	AMP	6	1				1					45		2	1	10
Cloranfenicol	CHL	6	4				1	1				75		4	1	15
Tetraciclina	TCY	6	5	1	1	2	1	1		2	1	227	1	10	1	38
Cefalotina	CEP						1			1		10				2
Cefoxitina	FOX									2		7				3
Ceftriaxona	CRO									1		2				
Gentamicina	GEN		1				1	2				31		3		5
Imipenem	IPM											1				
Ácido Nalidíxico	NAL		4		1		1	1		1		72		2	1	7
Sulfametoxazol-Trimetoprim	SXT		1		1		1	1		1		40		1		4
Nitrofurantoína	NIT	5	5	1	1		1	4			1	179		10	1	26

Tabela 9: Perfis plasmidiais obtidos, caracterizado pelos plasmídios encontrados (em kb) e distribuídos segundo a fonte de isolamento.

Perfis plasmidiais	Plasmídios (kb)				Fonte					No. isolados por perfil
					HU	AL	A	MP	AB	
p 1	188,8					3	2			5
p 2	151	143,5			1		2			3
p 3	151				6	1	4			11
p 4	151	98,2	90,6	60,4	1					1
p 5	151	52,9			1					1
p 6	151	45,3			1					1
p 7	151	7,6			1					1
p 8	151	30,2				1				1
p 9	203,9	75,5	45,3			1				1
p 10	203,9	188,8	143,5		1					1
p 11	166,1				1					1
p 12	143,5				5	4	5	1	4	19
p 13	143,5	135,9				3	1			4
p 14	143,5	68	52,9			1				1
p 15	143,5	135,9	68	45,3		1				1
p 16	143,5	22,7			1			1		2
p 17	143,5	135,9	52,9	45,3		1				1
p 18	135,9						2			
p 19	113,3						1			1
p 20	75,5	60,4				1				1
p 21	60,4						1			1
p 22	52,9	15,1				1				1
p 23	45,3					2				2
p 24	37,8	22,7			1	1			1	3
p 25	37,8	1,51				1				1
p 26	37,8	30,2	9,1					1		1
p 27	30,2								1	1
p 28	22,7								1	1
Não detectado					6	8	7	5	3	29

Total de cepas submetidas à análise plasmidial: 99

HU: Humana; AL: Alimentos; A: Animal; MP: Matéria-prima; CQ: Controle da Qualidade; AB: Ambiental.

A cepa de *S.* Typhimurium DT104 usada como padrão para este fagotipo não está inclusa nesta Tabela e apresentou o perfil “p 12”.

Tabela 10: Distribuição e freqüência dos perfis plasmidiais segundo o fagotipo.

Perfis plasmidiais	Fagotipo													No. isolados por perfil
	193	10	18	22	28	29	208	120	129	171	179	104	UT	
p 1	5													5
p 2	1		1										1	3
p 3	4						1						6	11
p 4	1													1
p 5	1													1
p 6														1
p 7											1			1
p 8	1													1
p 9	1													1
p 10	1													1
p 11	1													1
p 12	10	2				1	2		1				3	19
p 13	4													4
p 14			1											1
p 15					1									1
p 16	2													2
p 17	1													1
p 18	1											1		2
p 19	1													1
p 20													1	1
p 21	1													1
p 22						1								1
p 23	1		1											2
p 24	2												1	3
p 25	1													1
p 26				1										1
p 27										1				1
p 28	1													1
Não detectado	21		2				1	1		2			2	29

Total de cepas submetidas à análise plasmidial: 99

A cepa de *S.* Typhimurium DT104 usada como padrão para este fagotipo não está inclusa nesta Tabela e apresentou o perfil “P 12”.

UT= não tipificável.

Tabela 11: Distribuição e freqüência dos perfis plasmidiais de acordo com os marcos de resistência.

Perfis	Total de MR	Drogas											No. isolados por perfil
		AMP	CHL	TCY	CEP	FOX	CRO	GEN	IPM	NAL	SXT	NIT	
p 1	5	1	4	5				2		3	1	4	5
p 2	1	1	1	3						1	1	2	3
p 3	6	4	6	10	1	2		1		2	1	10	11
p 4	1			1						1		1	1
p 5													1
p 6													1
p 7				1								1	1
p 8	1	1	1	1				1					1
p 9	1			1						1	1	1	1
p 10	1		1	1							1	1	1
p 11	1	1	1	1	1					1	1	1	1
p 12	14	8	8	16	4	2	1	2		3	5	14	19
p 13	4	1	4	4				3		3	3	4	4
p 14	1		1	1						1	1	1	1
p 15	1			1						1	1	1	1
p 16	1		1	2							1	2	2
p 17	1		1							1		1	1
p 18	2	2	2	2	1					1		2	2
p 19	1	1		1						1		1	1
p 20	1			1						1		1	1
p 21	1		1	1							1	1	1
p 22				1									1
p 23	2		2	2						2		2	2
p 24	1			2	1	1	1					1	3
p 25	1	1	1	1							1		1
p 26				1								1	1
p 27	1			1	1	1	1						1
p 28	1		1		1							1	1
Não detectado	18	7	13	26	1	1		7	1	9	7	22	29

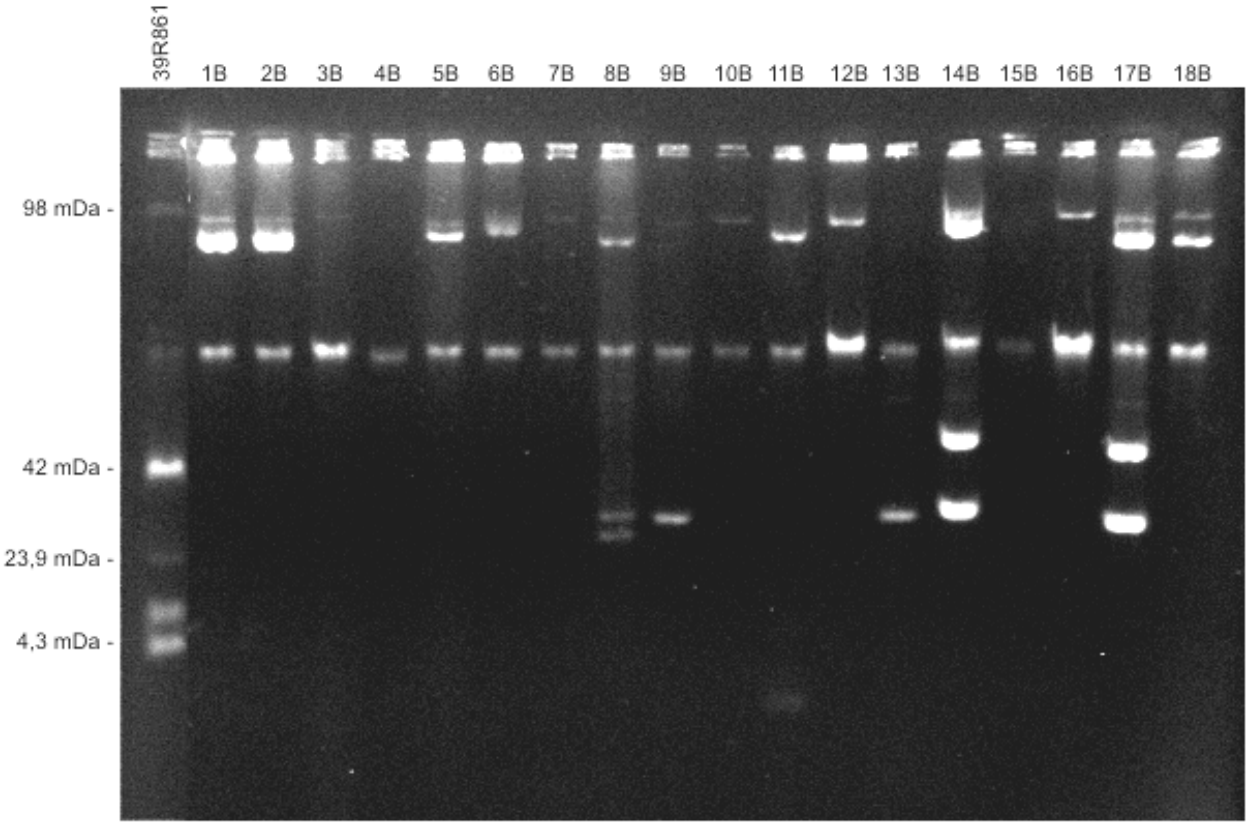
AMP: Ampicilina; CEP: Cefalotina; CHL: Cloranfenicol; CRO: Ceftriaxona; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; IPM: Imipenem; NAL: Ácido Nalidíxico; NIT: Nitrofurantoína; TCY: Tetraciclina; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprim.
MR: cepas multirresistentes (três ou mais grupos de antimicrobianos).

Tabela 12: Características das cepas de *S.* Typhimurium de origem humana avaliadas através de PFGE.

Amostra	Ano	Região	Perfil de resistência	Fagotipo	Perfil Plasmidial	Perfil PFGE
H1	1999	S	TCY NAL NIT	193	p4	P2
H2	1999	S	AMP CHL TCY NAL NIT	193	p12	P1
H3	2000	CO	CHL TCY NAL NIT	193	p3	P1
H4	2000	S	AMP CHL TCY FOX NIT	193	p3	P2
H5	2000	NE	CHL TCY NAL SXT NIT	193	p3	P1
H6	2002	S	AMP CHL TCY CEP NAL SXT NIT	193	p11	P3
H7	2002	S	CHL TCY SXT NIT	193	p16	P2
H8	1999	SE	TCY GEN	208	p12	P3
H9	2002	NE	TCY NIT	179	p7	P4
H10	2001	S	TCY	29	p12	P5
H11	2001	S	TCY NIT	UT	p12	P6
H12	2002	N	TCY NIT	193	ND	P7
H13	2003	SE	TCY NIT	193	p3	

N: Norte; NE: Nordeste; S: Sul; SE: Sudeste; CO: Centro-oeste.
AMP: Ampicilina; CEP: Cefalotina; CHL: Cloranfenicol; FOX: Cefoxitina; GEN: Gentamicina; NAL: Ácido Nalidíxico; NIT: Nitrofurantoína; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; TCY: Tetraciclina.
UT: Não tipificável.
ND: Não detectado.

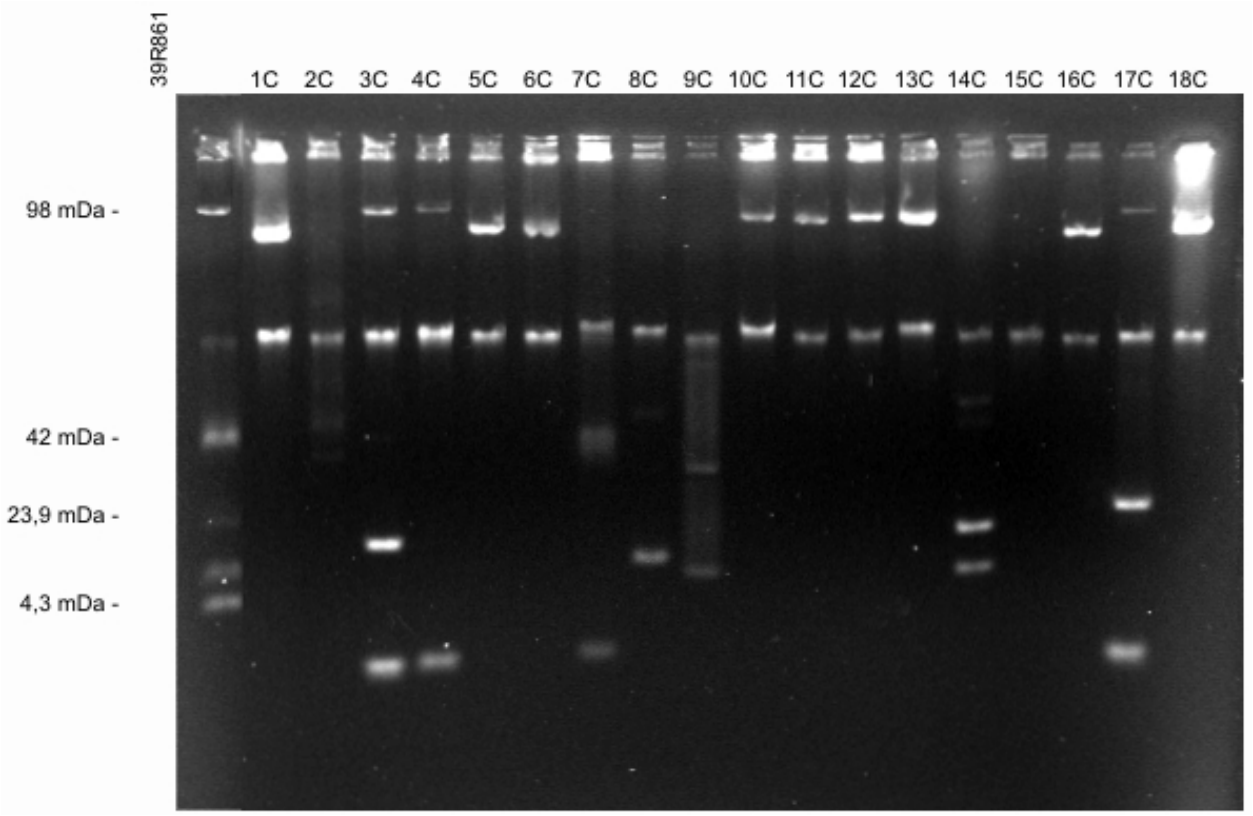
Figura 1 – Análise plasmidial de *S*. Typhimurium oriundas de diferentes fontes e regiões do país (cepas 1B a 18B).



1B a 3B, 6B, 18B – Fonte alimentar, região Sul.
4B – Fonte matéria-prima, região Sul.
5B, 10B, 12B, 15B – Fonte animal, região Sul.
7B – Fonte animal, região Sudeste.
8B, 9B, 13B, 14B, 17B – Fonte alimentar, região Sudeste.
11B – Fonte animal, região Centro-Oeste.
16B – Fonte humana, região Sul.

Perfil 3: 10B
Perfil 12: 6B, 7B, 12B, 16B
Perfil 13: 1B, 2B, 5B, 18B
Perfil 14: 14B
Perfil 15: 17B
Perfil 17: 8B
Perfil 18: 11B
Perfil 23: 9B, 13B
Não detectado: 3B, 4B, 15B

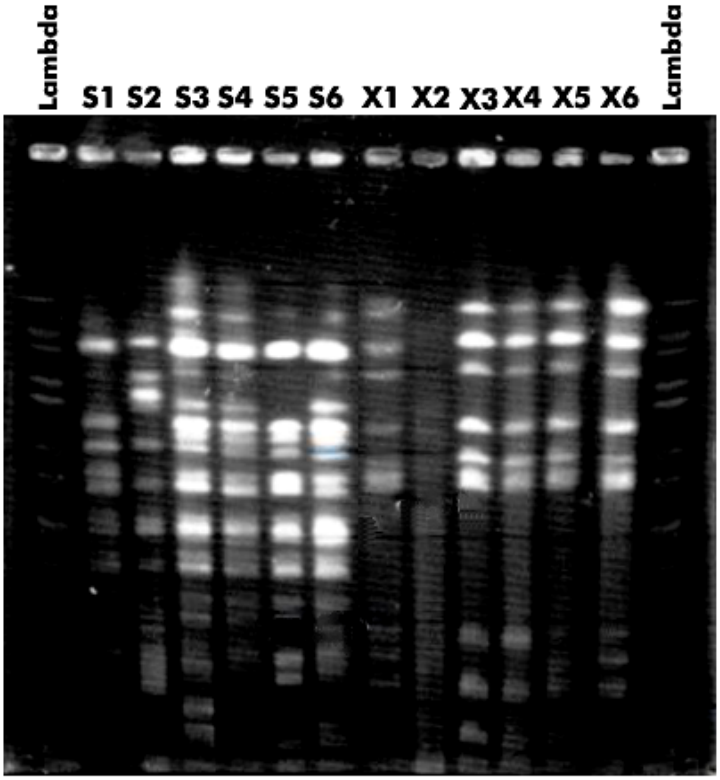
Figura 2 – Análise plasmidial de *S*. Typhimurium oriundas de diferentes fontes e regiões do país (cepas 1C a 18C).



1C, 2C, 4C, 6C, 7C, 12C – Fonte animal, região Sul.
3C – Fonte alimentar, região Centro-Oeste.
5C, 9C – Fonte alimentar, região Sul.
8C, 10C, 11C, 14C – Fonte ambiental, região Sudeste.
13C, 16C – Fonte alimentar, região Sudeste.
15C – Fonte matéria-prima, região Sul.
17C, 18C – Fonte humana, região Sul.

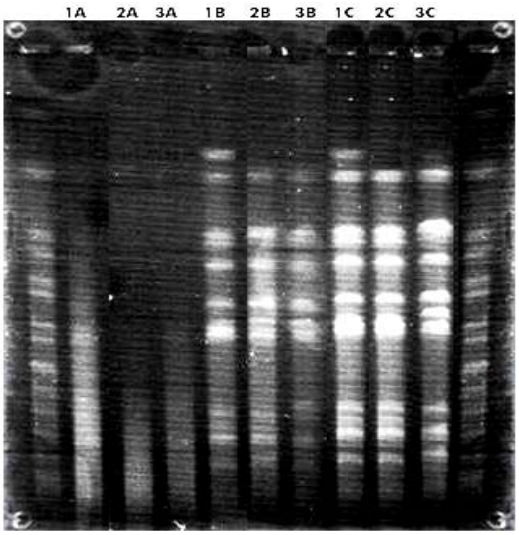
Perfil 2: 18C
Perfil 3: 4C
Perfil 4: 17C
Perfil 8: 3C
Perfil 12: 5C, 6C, 10C, 11C, 12C, 13C, 16C
Perfil 18: 1C
Perfil 21: 7C
Perfil 22: 9C
Perfil 24: 14C
Perfil 28: 8C
Não detectado: 2C, 15C

Figura 3 – Perfis de restrição do DNA cromossômico observados nas seis cepas de *S.* Typhimurium, gerados na eletroforese em campo pulsado, após digestão com as endonucleases *Spe*I e *Xba*I (teste das enzimas)



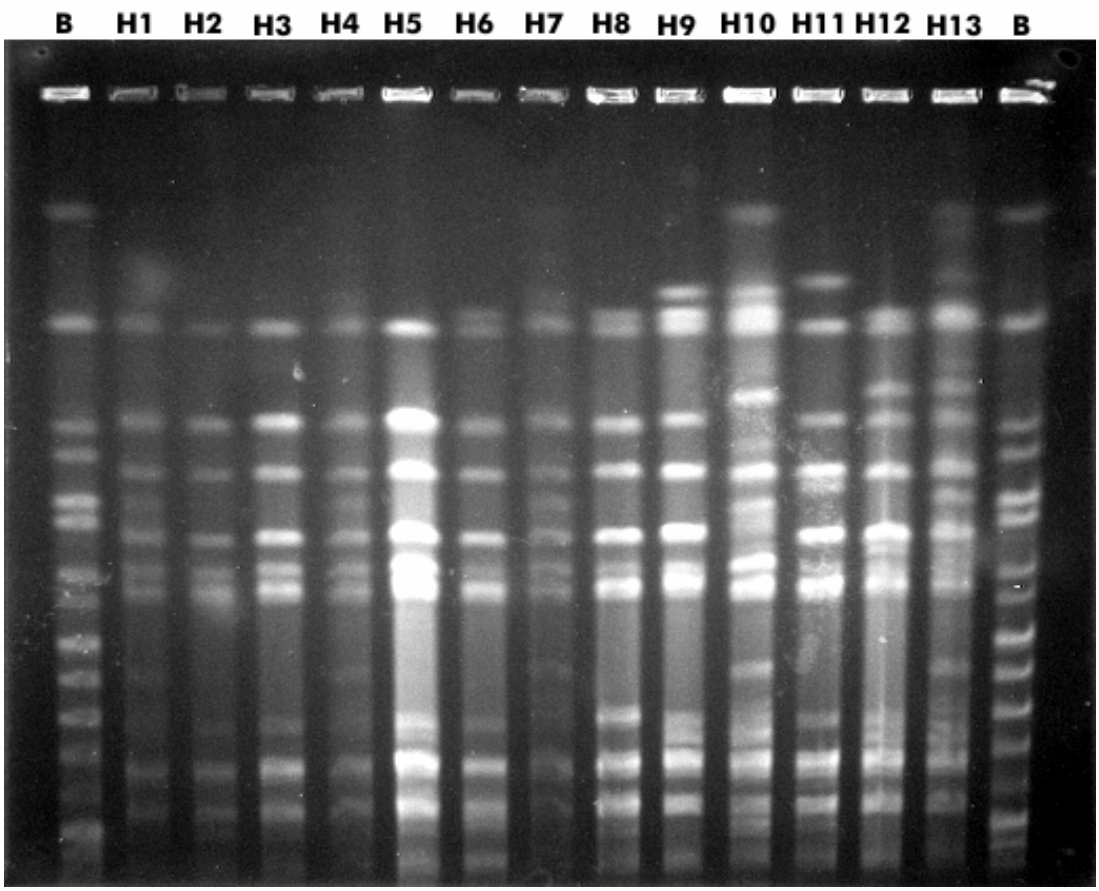
S1 a S6 – Cepas de *S.* Typhimurium (1 a 6) submetidas à digestão pela enzima *Spe*I.
X1 a X6 – Cepas de *S.* Typhimurium (1 a 6) submetidas à digestão pela enzima *Xba*I

Figura 4 – Perfis de restrição do DNA cromossômico observados em três cepas distintas de *S.* Typhimurium, gerados na eletroforese em campo pulsado, após digestão com a endonuclease *Xba*I (teste das variações de protocolo).



1A a 3A – Protocolo 1
1B a 3B – Protocolo 2
1C a 3C – Protocolo 3

Figura 5 – Perfis de restrição do DNA cromossômico observados nas 13 cepas de origem humana de *S*. Typhimurium, gerados na eletroforese em campo pulsado, após digestão com a endonuclease *Xba*I.



B: Cepa padrão *S*. Braenderup H9812
As características dos 13 isolados humanos utilizados na confecção deste gel estão ilustradas na Tabela 12 (página 67)

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados e na discussão anteriores, foram tecidas as seguintes conclusões:

- A multirresistência aos antimicrobianos é freqüente entre os isolados brasileiros, tendo sido observada em todos os anos, fontes e regiões geográficas.
- A análise plasmidial apresentou grande variedade de perfis e não houve associação entre estes à suscetibilidade aos antimicrobianos e aos fagotipos.
- Em contraposição aos relatos na literatura nacional, foi observado elevado percentual de cepas com plasmídios de peso molecular acima de 100 kb.
- O fagotipo de *S*. Typhimurium prevalente em nosso território é DT193.
- O fagotipo multirresistente DT104, disseminado mundialmente, já está presente no Brasil, tendo sido isolado de uma ave e sendo este o seu primeiro relato.
- A análise comparativa entre os métodos de tipagem clássicos e moleculares não apresentou relação direta entre si.
- Na amostragem de isolados humanos avaliada, foi observada correlação entre fagotipo prevalente e perfil obtido através de PFGE.

7. APÊNDICE

Discriminação das formulações de soluções e meios de cultura (não apresentados comercialmente desidratados, preparados por fórmula) utilizados na presente investigação:

1. Ágar Nutriente Fosfatado

Extrato de carne	3 g
Peptona	10 g
Cloreto de sódio	3 g
Fosfato dibásico de sódio $2.H_2O$	2 g
Ágar	10 g
Água destilada	1000 mL

Ajustar o pH para 7,3 $\pm$ 0,1. Distribuir em tubos com volume de 5 mL e esterilizar a 121°C/15 minutos.

2. Meio de triagem de Costa & Vérnin

Base semi-sólida:

Peptona	20 g
Cloreto de sódio	5 g
Solução de azul de timol	3 mL
Indicador de Andrade	10 mL
Ágar	50 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os componentes e ajustar o pH a 7,3 ou 7,4. Esterilizar a 121°C/15 minutos.

Base sólida:

Peptona	15 g
Triptona ou tripticase	5 g
Tiossulfato de sódio	0,2 g
Sulfato ferroso amoniacal	0,2 g

Solução de azul de timol	3 mL
Indicador de Andrade	10 mL
Ágar	20 g
Água destilada	1000 mL

Dissolver os componentes e ajustar o pH a 7,3 ou 7,4. Esterilizar a 121°C/15 minutos.

Solução de uréia e açúcares:

Uréia	20 g
Lactose	30 g
Sacarose	30 g
Água destilada	100 mL

Dissolver a mistura em banho-maria e esterilizar por filtração em filtro Seitz. Conservar em geladeira (4 a 8°C).

Fundir as bases e esfriar entre 50-60°C. Adicionar a cada uma delas, 5 mL de solução de uréia e açúcares para cada 100 mL de meio. Distribuir 2 a 2,5 mL de base semi-sólida em tubos esterilizados de 13 mm de diâmetro. Deixar solidificar e acrescentar, em seguida, o mesmo volume de base sólida, com o cuidado de inclinar os tubos desta vez.

3. Caldo de Lurian-Bertani

Triptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
Cloreto de sódio	5 g
Água deionizada	1000 mL

Ajustar o pH a 7,2 e esterilizar a 121°C/15 minutos.

4. Solução I

Glicose 20%	10 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	2 mL

Tris-HCl 1M pH 8,0	2,5 mL
Água bidestilada	85,5 mL

Preparar a partir de soluções estoque concentradas (glicose 20%, EDTA 0,5M, Tris-HCl 1M). Autoclavar a 121°C/15 minutos e conservar a 4°C.

5. Solução II

NaOH 10N	60 μL
SDS 10%	300 μL
Água bidestilada esterilizada	2640 μL

Preparar no momento do uso, a partir das soluções estoque (NaOH 10N e SDS 10%), mantidas a temperatura ambiente.

6. Solução III

Acetato de sódio 3M pH 4,8	2641 g
Água destilada	10 mL
Ácido acético glacial	

Dissolver o acetato de sódio em água destilada. Ajustar o pH a 4,8 com ácido acético glacial e completar o volume até 10 mL. Autoclavar a 121°C/15 minutos. Conservar a 4°C.

7. RNAse (10 mg/mL)

Preparar uma solução aquosa concentrada de RNAse a 10 mg/mL. Distribuir e armazenar a – 4 °C.

8. TBE 10x

Trisma base	484,4 g
EDTA	14,8 g
Ácido bórico	247,2 g

Água destilada	qsp 4 L

Pesar os reagentes e dissolvê-los em água destilada. Adicionar a solução em balão volumétrico, completar o volume com água destilada. Manter a temperatura ambiente.

9. Tampão carreador de amostras

0,25% azul de bromofenol
0,25% xileno cianol
15% Ficoll tipo 400
Água destilada

Dissolver o Ficoll em água destilada quente. Adicionar os corantes. Manter a temperatura ambiente.

10. Solução de brometo de etídio (5 mg/mL)

Preparar em água destilada. Conservar a temperatura ambiente, protegido da luz (frasco escuro ou envolto em papel alumínio).

11. Solução TEN

EDTA 0,5m pH 7,0	5,0 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	5,0 mL
Trisma base 1M pH 7,0	2,5 mL
Trisma base 1M pH 8,0	2,5 mL
NaCl 4M	1875 mL
Água destilada	qsp 50 mL

Adicionar as soluções estoque em balão volumétrico de 50 mL. Completar o volume. Autoclavar a 121°C/15 minutos.

12. Tampão EC

EDTA 0,5M pH 7,0	5,0 mL

EDTA 0,5M pH 8,0	5,0 mL
Trisma base 1M pH 7,0	1,5 mL
Trisma base 1M pH 8,0	1,5 mL
NaCl	29,22 g
N-lauril sarcosil	2,5 g
Brij 58	2,5 g
Deoxicolato de sódio	1 g
Água destilada	qsp 500 mL

Pesar os reagentes sólidos, dissolver em 200 mL de água destilada. Deixar a solução em repouso para que ocorra dissolução total dos reagentes. Em balão volumétrico, adicionar os reagentes dissolvidos aos volumes de soluções estoque e complementar o volume para 500 mL. Filtrar com membrana filtrante (0,22 μm).

13. Tampão CHEF-TE 1x

EDTA 0,5M pH 7,0	5,0 mL
EDTA 0,5M pH 8,0	5,0 mL
Trisma base 1M pH 7,0	2,5 mL
Trisma base 1M pH 8,0	2,5 mL
Água destilada	qsp 50 mL

Em balão volumétrico, adicionar os volumes das soluções estoque e completar com água destilada para 50 mL. Autoclavar a 121°C/15 minutos.

14. Tampão ES

EDTA 625mM pH 9,3	40 mL
N-lauril sarcosil 5%	10 mL

Adicionar os volumes em frasco de vidro e filtrar com membrana filtrante.

15. Proteinase K (20 mg/mL)

Proteinase K	500 mg

Água destilada esterilizada	25 mL

Esterilizar através de membrana filtrante (0,22 μm). Distribuir em volumes de 1 mL. Conservar a -20°C.

16. Tampão ESP

Tampão ES	2,0 mL
Proteinase K (20 mg/mL)	0,1 mL

Calcular esta formulação por amostra. Preparar no momento de uso.

17. Tampão DNS

Trisma base 1M pH 8,0	5,0 mL
$MgCl_2$ 1M	250 μL
Água destilada	qsp 250 mL

Adicionar os volumes em balão volumétrico, completar o volume para 250 mL. Autoclavar a 121°C/15 minutos. Conservar a temperatura ambiente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUZEED, Y.M.; HARIHARAN, H.; POPPE, C.; KIBENGE, F.S.B. Characterization of *Salmonella* isolates from beef cattle, broiler chickens and human sources on Prince Edward Island**. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, n. 23, p. 253-266, 2000.

ACHA, P.N.; SZYFRES, B**. Zoonosis y enfermidades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 2 ed. Washington: Organización Mundial de la Salud, 1986.

AITMHAND, R.; SOUKRI, A.; MOUSTAOUI, N.; AMAROUCH, H.; ELMDAGHRI, N.; SIROT, D.; BENBACHIR, M. Plasmid-mediated TEM-3 extended-spectrum β-lactamase production in *Salmonella* Typhimurium in Casablanca. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 49, p. 169-172, 2002.

ALVES, J.C.; LÁZARO, N.S.; HOFER, E.; REIS, E.M.; RODRIGUES, D.P. *Salmonella* sp em suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro. Secretaria Municipal de Saúde do Município do Rio de Janeiro. Publicado em: 19/12/2001. Disponível em <http://saude.rio.rj.gov.br>. Acesso em: 06/09/2003.

ALTEKRUSE, S.F.; TOLLEFSON, L.K.; BÖGEL, K. Control strategies for *Salmonella* Enteritidis in five countries. **Food Control**, n. 4, p. 10-16, 1993.

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

ANGULO, F.J.; JOHNSON, K.R.; TAUXE, R.V.; COHEN, M.L. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. **Microbial Drug Resistance**, n. 1, v. 6, p. 77-83, 2000.

ARAÚJO, E.; PACHECO, M.A.S.R.; BONI, R. F.; FONSECA, Y. S. K.; GELLI, D.S.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T. Surtos alimentares por *Salmonella* Enteritidis, associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. **Higiene Alimentar**, n. 9, v. 40, p. 24-26, 1995.

ARMAND-LEFEVRE, L.; LEFLON-GUIBOUT, V.; BREDIN, J.; BARGUELLIL, F.; AMOR, A.; PAGES, J.M.; NICOLAS-CHANOINE, M.H. Imipenem resistance in *Salmonella enterica* serovar Wien related to porin loss and CMY-4 beta-lactamase production. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, n. 3, v. 47, p. 1165-1168, 2003.

ARTHUR, G.; NDUBA, V.N.; KARIUKI, S.M.; KIMARI, J.; BHATT, S.M.; GILKS, C.F. Trends in bloodstream infections among humans immunodeficiency virus-infected adults admitted to a hospital in Nairobi, Kenya, during the last decade. **Clinical Infectious Diseases**, n. 33, p. 248-256, 2001.

ASENSI, M.D.; COSTA, A.P.; REIS, E.M.F.; HOFER, E. Lysotypes and plasmidial profile of *Salmonella* serovar Typhimurium isolated from children with enteric processes in the cities of Rio de Janeiro, RJ, and Salvador, BA – Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 37, v. 4, p. 297-302, 1995.

ASENSI, M.D.; HOFER, E. A Serovars and multiple drug resistant *Salmonella* sp isolated from children in Rio de Janeiro, Brazil. **Revista de Microbiologia de São Paulo**, n. 3, v. 25, p.149-153, 1994.

ASENSI, M.D.; SOLARI, C.A.; HOFER, E. A *Salmonella* Agona outbreak in a pediatric hospital in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 1, p.1-4, Jan/Mar 1994.

BAGGESEN, D.L.; SANDVANG, D.; AARESTRUP, F.M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated from Denmark and camparison with isolates from Europe and the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 4, v. 38, p. 1581-1586, 2000.

BAQUAR, N.; THRELFALL, E.J.; ROWE, B.; STANLEY, J. Phage type 193 of *Salmonella* Typhimurium contains different chromosomal genotypes and multiple IS200 profiles. **FEMS Microbiology Letters**, n. 115, p. 291-296, 1994.

BARRETO, D. Apostila de noções básicas do direito administrativo e sanitário, 2002.

BARRETO, E.S.S. Patógenos emergentes: salmonelose. Secretaria Municipal de Saúde do Município do Rio de Janeiro. Publicado em: 19/12/2001. Disponível em <http://saude.rio.rj.gov.br>. Acesso em: 06/09/2003.

BAUERNFEIND, A.; CASELLAS, J.M.; GOLDBERG, M.; HOLLEY, M.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella* Typhimurium. **Infection**, n. 20, p. 158-163, 1992.

[A]BAUERNFEIND, A.; STEMPLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; AMANN, S.; AKALIN, E. Characterization of β-lactamase gene bla_{PER-2}, which encodes na extended-spectrum class A β-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 40, p. 616-620, 1996.

[B]BAUERNFEIND, A.; STEMPLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; ERNST, S.; CASELLAS, J.M. Sequences of β-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other β-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 40, p. 509-513, 1996.

BEARSON, S.; BEARSON, B.; FOSTER, J.W. Acid stress responses in enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**, n. 147, p. 173-180, 1997.

BENDER, J.B.; HEDBERG, C.W.; BOXRUD, D.J.; BESSER, J.M.; WICKLUND, J.H.; SMITH, K.E.; OSTERHOLM, M.T. Use of molecular subtyping in surveillance for *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **The New England Journal of Medicine**, n. 3, v. 344, p. 189-195, 2001.

BENNISH M. Treatment of infectious diarrhea: the role of antimicrodial therapy. APUA Newsletter, n. 13, v. 1, 1995. Disponível em: <www.healthsci.tufts.edu/apua/newsletter/13_4a.html>.

BENREDJEB, S.; BENYAGHLANE, H.; BOUJNAH, A.; PHILIPPON, A.; LABIA, R. Synergy between clavulanic acid and newer β-lactams on nine clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium resistant to third-generation cephalosporins. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 21, p. 263-266, 1988.

BESSER, T.E.; GOLDOFT, M.; PRITCHETT, L.C.; KHAKHRIA, R.; HANCOCK, D.D.; RICE, D.H. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infections of humans and domestic animals in the Pacific North-west of the United States. **Epidemiology and Infection**, n. 124, p. 193-200, 2000.

BEZANSON, G.S.; KHAKHRIA, R.; DUCK, D.; LIOR, H. Molecular analysis confirms food source and simultaneous involvement of two distinct but related subgroups of *Salmonella* Typhimurium bacteriophage type 10 in major interprovidencial *Salmonella* outbreak. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 5, v. 50, p. 1279-1284, 1985.

BIENDO, M.; THOMAS, D.; DECHEPY, O.; LAURANS, G.; EB, F. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 293, p. 219-223, 2003.

BIESDORF, S.M. **Aspectos microbiológicos e epidemiológicos dos surtos causados por *Salmonella* sp em criações não industriais de *Gallus gallus domesticus* no estado do Paraná**. Londrina: UFPR, 1994. 111p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, setor de Ciências Agrárias, Paraná.

BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acid Research**, n. 7, p.1513-1523. 1979.

BIRREN, B.; LAI, E. **Pulsed field gel electrophoresis: a practical guide**. San Diego: Academic Press Inc., 1993.

BOLTON, L.; KELLEY, L.C.; LEE, M.D.; FEDORKA-CRAY, P.J.; MAURER, J.J. Detection of Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 5, v. 37, p. 1348-1351, 1999.

BOYD,D.; PETERS, G.A.; CLOECKAERT, A.; BOUMEDINE, K.S.; CHASLUS-DANCLA, E.; IMBERECHTS, H.; MULVEY, M. Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. **Journal of Bacteriology**, n. 19, v. 183, p. 5725-5732, 2001.

BRASIL. Constituição da República Federativa do Brasil de 05 de outubro de 1988. Disponível em: <https://legislacao.planalto.gov.br>. Acesso em: 24 nov 2004.

[A]BRASIL. Lei nº 8080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 de setembro de 1990.

[B]BRASIL. Lei nº 8078 de 11 de setembro de 1990. Dispõe sobre a Proteção do Consumidor e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de setembro de 1990.

BRASIL. Lei n° 6437 de 20 de agosto de 1977. Configura infrações à Legislação Sanitária Federal, estabelece as sanções respectivas, e dá outras providências. Disponível em: <https://www.presidencia.gov.br>. Acesso em: 24 nov 2004.

[A]BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 386 de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de alimentos. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 24 nov 2004.

[B]BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 326 de de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre "Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos". Disponível em: < http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=100>. Acesso em: 24 nov 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 46 de 10 de fevereiro de 1998. Manual Genérico de Procedimentos para APPCC em Indústrias de Produtos de Origem Animal. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 24 nov 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 193 de 19 de setembro de 1994. Institui o Programa Nacional de Sanidade Avícola no âmbito da Secretaria de Defesa Agropecuária e cria o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 24 nov 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº. 115 de 4 de outubro de 1995. Determina as atribuições do Comitê Consultivo do Programa Nacioanl de Sanidade Avícola. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 24 nov 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n°. 39 de 21 de julho de 1999. Reformula o Comitê Consultivo do Programa de Sanidade Avícola. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 24 nov 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Executiva. **Sistema Único de Saúde (SUS): princípios e conquistas**. Brasília: Ministério da Saúde, 2000. 44p.

[A]BRASIL. RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 de janeiro de 2001.

[B]BRASIL. RDC n° 13 de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados, em anexo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 de janeiro de 2001.

BRASIL. RDC n° 275 de 21 de outubro de 2002. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos produtores/Industrializadores de Alimentos e a Lista de verificação de Boas práticas de Fabricação em estabelecimentos produtores/Industrializadores de alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de outubro de 2003.

BRIGGS, C.E.; FRATAMICO, P.M. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 43, p. 846-849, 1999.

BRUNNER, F.; MARGADANT, A.; PEDUZZI, R.; PIFFARETTI, J.C. The plasmid pattern as anaepidemiologycal tool for *Salmonella* Typhimurium epidemics. Comparison with the lysotypes**. Journal of Infectious Diseases**, n. 148, p. 7-11, 1983.

BUCHAMAN, R.L.; EDELSON, S.G. Effect of pH-dependent, stationary phase acid resistance on the thermal tolerance of Escherichia coli O157:H7. **Food Microbiology**, n. 166, p. 447-458, 1999.

CALLOW, B.R. A new phage-typing scheme for *Salmonella* Tiphimurium. **Journal of Higiene**, n. 57, p.346-359, 1959.

CARATOLLI, A.; TOSINI, F.; GILES, W.P.; RUPP, M.E.; HINRICHS, S.H.; ANGULO, F.J.; BARRETT, T.J.; FEY, P.D. Characterization of plasmids carrying CMY-2 from expanded-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella* strains isolated in the United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 5, v. 46, p. 1269-1272, 2002.

CARATTOLI, A.; TOSINI, F.; VISCA, P. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. **The New England Journal of Medicine**, n. 339, p. 921-922, 1998.

CARLSON, S.A.; STOFFREGEN, W.C.; BOLIN, S.R. Abomasitis associated with multiple antibiotic resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phagetype DT104. **Veterinary Microbiology**, v. 85, n. 3, p.233-240, Mar. 2002.

CARVALHO, C. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. In: **Direito Sanitário Brasileiro**. São Paulo: Quartier Latin, 2004. 350p.

CASIN, I.; BREUIL, J.; BRISABOIS, A.; MOURY, F,; GRIMONT, F.; COLLATZ, E. Multidrug-resistant human and animal *Salmonella* Typhimurium isolates in France belong predominantly to a DT104 clone with the chromosome- and integron-encoded β-lactamase PSE-1. **Journal of Infectious Diseases**, n. 179, 1173-1182, 1999.

CASIN, I.; BREUIL, J.; DARCHIS, J.P.; GUELPA, C.; COLLATZ, E. Fluoroquinolone resistance linked to GyrA, GyrB, and ParcC mutations in *Salmonella enterica* Typhimurium isolates in humans. **Emerging Infectious Diseases**, n.11, v. 8, p. 1455-1457, 2003.

[A]CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. FOODNET – Foodborne disease active surveillance network. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodnet>. Acesso em: 24 nov. 2004.

[B]CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. PULSENET. Disponível em: <http://www.cdc.gov/pulsenet/index.htm >. Acesso em: 24 nov. 2004

CHALKER, R.B.; BLASER, M.J. A review of human Salmonellosis. III. Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. **Reviews of Infectious Diseases**., n. 10, p. 111-123, 1988.

CHANG, Y.H. Prevalence of *Salmonella* spp in poultry broilers and shell eggs in Korea. **Journal of Food Protection**, n. 63, p. 655-658, 2000.

CHEESBROUGH, J.S.; TAXMAN, B.C.; GREEN, S.D.; MEWA, F.I.; NUMBI, A. A clinical definition for invasive *Salmonella* infection in African children**. Pediatric Infectious Disease Journal**, n. 16, p. 277-283, 1997.

CHIAPPINI, E.; GALLI, L.; PECILE, P.; VIERUCCI, A.; DE MARTINO, M. Results of a 5-year prospective surveillance study of antibiotic resistance among *Salmonella enterica* isolates and ceftriaxone therapy among children hospitalized for acute diarrhea. **Clinical Therapeutics**, n. 10, v. 24, p. 1585-1594, 2002.

CHU, C.; HONG, S.F.; TSAI, C.; LIN, W.S.; LIU, T.P.; OU, J.T. Comparative physical and genetic maps of the virulence plasmids of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Choleraesuis, and Dublin. **Infection and Immunity**, n. 67, p. 2611-2614, 1999.

CLOECKAERT, A.; SCHWARZ, S. Molecular characterization, spread and evolution of multidrug resistance in *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. **Veterinary Research**, n. 32, p. 301-310, 2001.

CLOECKAERT, A.; SIDI BOUMEDINE, K.; FLAUJAC, G.; IMBERECHTS, H.; D'HOOGHE, I.; CHASLUS-DANCLA, E. Ocurrence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the *floR* gene in *S. enterica* serovar Agona. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 44, p. 1359-1361, 2000.

COHEN, M.L. Changing patterns of infectious disease. **Nature**, n. 406, p. 762-767, 2000.

COHEN, M.L.; TAUXE, R.V. Drug-resistant *Salmonella* in the United States: na epidemiologic perspective. **Science**, n. 234, p. 964-969, 1986.

[A]COMISSÃO DO CODEX ALIMENTARIUS. Principles for the establishment and application of microbiological criteria for foods. **CAC/GL 21**, 1997.
[B]COMISSÃO DO CODEX ALIMENTARIUS. Principles for the development of microbiological criteria for animal products and products of animal origin intended for human consumption. **European Commission**, Luxembourg, 1997.

[A]COMISSÃO DO CODEX ALIMENTARIUS. Draft principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. **Alinorm 99/13A**, Appendix A, 1999.

[B]COMISSÃO DO CODEX ALIMENTARIUS. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. **CAC/GL 30**, 1999.

CORBETT-FEENEY, G.; RIAIN, U.N. The use of pulsed-field gel electrophoresis for subdivision of *Salmonella* typhimurium in an outbreak situation. **The Journal of Infection**, n. 2, v. 36, p. 175-177, 1998.

COSTA, R.G. **Análise dos marcadores epidemiológicos em *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum, oriundas de diferentes regiões do país.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 1998. 73p. il. tab. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Rio de Janeiro.

COSTA, G.A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de enterobactérias**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1972. 120p. Monografia – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

CRUCHAGA, S.; ECHEITA, A.; ALADUEÑA, A.; GARCÍA-PEÑA, J.; FRIAS, N.; USERA, M.A. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 47, p.315-321, 2001.

CRUMP, J.A.; GRIFFIN, P.M.; ANGULO, F.J. Bacterial contamination of animal feed and its relationship to human foodborne illness. **Clinical and Infectious Disease**, n. 7, v. 35, p. 859-865, 2002.

DALY, M.; FANNING, S. Characterization and chromosomal mapping of antimicrobial resistance genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium**. Applied and Environmental Microbiology**, n. 11, v. 66, p. 4842-4848, 2000.

DALY, M.; VILLA, L.; PEZZELLA, C.; FANNING, S.; CARATOLLI, A. Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 55, p. 558-561, 2005.

DAVIES, M.A.; HANCOCK, D.D.; BESSER, T.E. Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: the importance of dissemination. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, n. 3, v. 140, p. 135-141, 2002.

DIAS, H.P. **A responsabilidade pela saúde: aspectos jurídicos**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1995. 69p.

DUNNE, E.F.; FEY, P.; KLUDT, P.; REPORTER, R.; MOSTASHARI, F.; SHILLAM, P. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC β-lactamase. **The Journal of the American Medical Association**, n. 284, p. 3151-3156, 2000.

EBNER, P.D.; MATHEW, A.G. Three molecular methods to identify *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104: PCR fingerprinting, multiplex PCR and rapide PFGE. **FEMS Microbiology Letters**, n. 205, p. 25-29, 2001.

EDRINGTON, T.S.; SCHULTZ, C.L.; BISCHOFF, K.M.; CALLAWAY, T.R.; LOOPER, M.L.; GENOVESE, K.J.; JUNG, Y.S.; McREYNOLDS, J.L.; ANDERSON, R.C.; NISBET, D.J. Antimicrobial resistance and serotype prevalence of *Salmonella* isolated from dairy cattle in the southwestern United States. **Microbial Drug Resistance**, n. 1, v. 10, p. 51-56, 2004.

ELLIS, T.; ROWE, J.; LLOYD, J. Acute abomasitis due to *Clostridium septicum* infection in experimental sheep. **Austalian Veterinary Journal**, n. 60, p. 308-309, 1983.

ENDTZ, H.P.; RUIJS, G.J.; VAN KLINGEREN, B.; JANSEN, W.H.; VAN DER REYDEN, T.; MOUTON, R.P. Quinolone resistance in *Campylobacter* isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 27, p. 199-208, 1991.

ESAKI, H.; MORIOKA, A.; ISHIARA, K.; KOJIMA, A.; SHIROKI, S.; TAMURA, Y.; TAKAHASHI, T. Antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolated from cattle, swine and poultry (2001-2002): report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 53, p.266-270, 2004.

EVANS, S.; DAVIES, R. Case control study of multiple resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 infection in Great Britain. **Veterinary Records**, n. 139, p. 557-558, 1996.

EWING, W.H. **Edward's & Ewing Identification of Enterobacteriaceae**. 4th ed. New York: Elsevier Sci Publ CO Inc, 1986. 536p.

FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 10, p.1091-1101, 1996.

FEINMAN, S.E. Antibiotic in animal feed – drug resistence reviseted. **ASM News**, n. 64, p. 24-30, 1998.

FEY, P.D.; SAFRANEK, T.J.; RUPP, M.E.; DUNNE, E.F.; RIBOT, E.; IWEN, P.C.; BRADFORD, P.A.; ANGULO, F.J.; HINRICHS, S.H. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. **The New England Journal of Medicine**, n. 17, v. 342, p. 1242-1248, 2000.

FONSECA, E.L. **Caracterização dos perfis de resistência a antimicrobianos e diversidade genômica em cepas de *Salmonella* Infantis isoladas no Brasil de 1994 a**

2001. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2003. 86p. il., tab. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FRANA, T.; CARLSON, S.; GRIFFITH, R.W. Relative distribuition and conservation of genes encoding aminoglycoside enzymes in *Salmonella* Typhimurium DT104. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 67, p. 445-448, 2001.

FROST, J.A.; ROWE, B.; WARD, L.R.; THRELFALL, E.J. Characterization of resistance plasmids and carried phages in na epidemic clone of multiresistant *Salmonella* Typhimurium in India. **The Journal of Hygiene**, n. 88, p. 193-204, 1983.

FROST, J.A.; THRELFALL, E.J.; ROWE, B. Antibiotic resistance in salmonellas from humans in England and Wales: the situation in 1994. **PHLS Microbiol Digest**, n. 12, p. 131-133, 1995.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; MENDES, R.E.; JONES, R.N. *Salmonella* spp. Isolates causing bloodstream infections in Latin America: report of microbial activity from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, n. 44, p. 313-318, 2002.

[A]GAZOULI, M.; SIDORENKO, S.V.; TZELEPI, E.; KOZLOVA, N.S.; GLADIN, D.P.; TZOUVELEKIS, L.S. A plasmid-mediated β-lactamase conferring resistance to cefotaxime in a *Salmonella* Typhimurium clone found in St Petersburg, Russia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 41, p. 119-121, 1998.

[B]GAZOULI, M.; TZELEPI, E.; MARKOGIANNAKIS, A.; LEGAKIS, N.J.; TZOUVELEKIS, L.S. Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing β-lactamases (CTX-M5 and CTX-M6) from *Salmonella* Typhimurium. **FEMS Microbiology Letters**, n. 165, p. 289-293, 1998.

[C]GAZOULI, M.; TZELEPI, E.; SIDORENKO, S.V.; TZOUVELEKIS, L.S. Sequence of the gene encoding a plasmid-mediated cefotaxime-hidrolyzing class A β-lactamase

CTX-M4: involvement of serine 237 in cephalosporin hydrolysis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 42, p. 1259-1262, 1998.

GAZOULI, M.; TZOUVELEKIS, L.S.; PRINARAKIS, E.; MIRIAGOU, V.; TZELEPI, E. Transferable cefoxitin resistance in enterobacteria from Greek hospitals and characterization of a plasmid-mediated group 1 β-lactamase (LAT-2). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 40, p. 1736-1740, 1996.

GEBREYES, W.A.; ALTIER, C. Molecular characterization of multidrug-resistant *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from swine. **Journal of Clinical microbiology**, n. 8, v. 40, p. 2813-2822, 2002.

GEBREYES, W.A.; THAKUR, S. Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Muenchen from pigs and humans and potential interserovar transfer of antimicrobial resistance. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, n. 2, v. 49, p. 503-511, 2005.

GEIMBRA, M.P.; TONDO, E.C.; DE OLIVEIRA, F.A.; CANAL, C.W.; BRANDELLI, A. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. **Journal of Food Protection**, n. 67, v. 6, p. 1229-1233, 2004.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 629p.

GIRAUD, E.; CLOECKAERT, A.; KERBOEUF, D.; CHASLUS-DANCLA, E. Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 44, p. 1223-1228, 2000.

GLYNN. M.K.; BOPP, C.; DEWITT, W.; DABNEY, P.; MOKHTAR, M.; ANGULO, F.J. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 infections in the United States. **The New England Journal of Medicine**, n. 338, n. 1333-1338, 1998.

GORMAN, R.; ADLEY, C. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from human, food, and animal sources in the Republic of Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 5, v. 42, p. 2314-2316, 2004.

GREEN, S.D.; CHEESBROUGH, J.S. *Salmonella* bacteraemia among young children at a rural hospital in western Zaire. **Annals of Tropical Pediatrics**, n. 13, p. 45-53, 1993.

GUERRA, B.; LACONCHA, I.; SOTO, S.M.; GONZÁLEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Molecular characterization of emergent muliresistant *Samonella enterica* serotype [4,5,12:i: –] organisms causing human salmonellosis. **FEMS Microbiology Letters**, n. 190, p. 341-347, 2000.

GUERRA, B.C.S.; MENDOZA, M.C. Antimicrobial resistance and spread of class I integrons among *Salmonella* serotypes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, n. 44, p. 2166-2169, 2000.

HAKANEN, A.; SIITONEN, A.; KOTILAINEN, P.; HUOVINEN, P. Increasing fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serotypes in Finland during 1995–1997. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 43, p. 145-148, 1999.

HAMPTON, M.D.; THRELFALL, E.J.; FROST, J.A.; WARD, L.R.; ROWE, B. *Salmonella* Typhimurium DT193: differentiation of an epidemic definitive type by antibiogram, plasmid profile, plasmide fingerprint and *Salmonella* plasmid virulence (*spv*) gene probe. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 78, p. 402-408, 1995.

HEIR, E.; LINDSTEDT, B.A.; NYGARD, I.; VARDUND, T.; HASSELTVEDT, V.; KAPPERUD, G. Molecular epidemiology of *Salmonella* Typhimurium isolates from human sporadic and outbreak cases. **Epidemiology and Infection**, n. 128, p. 373-382, 2002.

HELMUTH, R.; STEPHAN, R.; BUNGE, C.; HOOG, B.; STEINBECK, A.; BULLING, E. Epidemiology by virulence-associated plasmids and outer membrane protein patterns within seven common *Salmonella* serotypes. **Infection and Immunity**, n. 48, p. 175-182, 1985.

HERNANDEZ, T.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, C.; AREVALO, M.P.; TORRES, A; SIERRA, A.; ARIAS, A. Antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serovars isolated from chickens in Spain. **Journal of Chemotherapy**, n. 4, v. 14, p. 346-350, 2002.

HERNANDEZ, T.; SIERRA, A.; RODRIGUEZ-ALVAREZ, C.; TORRES, A; AREVALO, M.P.; CALVO, M.; ARIAS, A. *Salmonella enterica* serotypes isolated from imported frozen chicken meat in the Canary islands. **Journal of Food Protection**, n. 12, v. 68, p. 2702-2706, 2005.

HOFER, E. Considerações sobre a freqüência de sorotipos de *Salmonella* na cidade do Rio de Janeiro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 72, p. 63-72, 1974.

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 São Paulo**, n. 36, v. 1, p. 7-9, 1994.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.I.; DOS REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 17, p. 55-62, 1997.

HOFER, E.; SILVA FILHO, S.I.; DOS REIS, E.M.F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 18, p. 21-27, 1998.

HOHMANN, E.L. Nontyphoidal salmonellosis. **Clinical Infectious Disease**, n. 32, p. 263-269, 2001.

HOLMBERG, S.D.; WACHSMUTH, I.K.; HICKMAN-BRENNER, F.W.; COHEN, M.L. Comparison of plasmid profile analysis, phage typing, and antimicrobial susceptibility testing in characterizing *Salmonella* Typhimurium isolates from outbreaks. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 19, p. 100-104, 1984.

HUMPHREY, T. *Salmonella* Typhimurium definitive type 104 – a multi-resistant *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, n. 67, p. 173-186, 2001.

IMBERECHTS, H.; D'HOOGHE, I.; BOUCHET, H.; GODARD, C.; POHL, P. Apparent loss of enrofloxacin resistance in bovine *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Belgium, 1991 to 1998. **The Veterinary Record**, n. 147, p. 76-77, 2000.

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

KARIUKI, S.; OUNDO, J.O.; MUYODI, J.; LOWE, B.; THRELFALL, E.J.; HART, C.A. Genotypes of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from two regions of Kenya. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n. 29, p. 9-13, 2000.

KARIUKI, S.; REVATHI, G.; GAKUYA, F.; YAMO, V.; MUYODI, J.; HART, C.A. Lack of clonal relationship between non-typhi *Salmonella* strain types from humans and those isolated from animals living in close contact**. FEMS Immunology and Medical Microbiology**, n. 33, p. 165-171, 2002.

KARIUKI, S.; REVATHI, G.; KARIUKI, N.; MUYODI, J.; MWITURIA, J.; MUNYALO, A.; KAGENDO, D.; MURUNGI, L.; HART, C.A. Increasing prevalence of multidrug-resistant non-typhoidal salmonellae, Kenya, 1994-2003. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 25, p. 38-43, 2005.

KHAKHRIA, R.; BEZANSON, G.; DUCK, D.; LIOR, H. The epidemic spread of *Salmonella* Typhimurium phage type 10 in Canadá (1970-1979). **Canadian Journal of Microbiology**, n. 29, p. 1583-1588, 1983.

KOHL, K.S.; FARLEY, T.A. Initially unrecognized distribuition of a commercially cooked meat product contamined over several months with *Salmonella* serotype Infantis. **Epidemiology and Infection**, n. 125, p. 491-498, 2000.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN Jr., W.C. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

LAILLER, R.; GRIMONT, F.; JONES, Y.; SANDERS, P.; BRISABOIS, A. Subtyping of *Salmonella* Typhimurium by pulsed-field gel electrophoresis and comparisons with phage types and resistance types. **Pathologie Biologie**, n. 50, p. 361-368, 2002.

LAWSON, A.J.; DASSAMA, M.U.; WARD, L. R.; THRELFALL, E.J. Multiply resistant (MR) *Salmonella enterica* serotype DT12 and DT120: a case of MR DT104 in disguise? **Emerging Infectious Diseases**, n.4, v. 8, p. 434-436, 2002.

LÁZARO, N.S.; TIBANA, A.; REIS, E.M.F.; VIANNI, M.C.E.; HOFER, E. Resistência a antimicrobianos em sorovares de *Salmonella* isolados de suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, n. 1, v. 25, p. 14-18, 2003.

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

LE MINOR, L. Typing of *Salmonella* species. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, n. 2, v. 7, p. 214-218, 1988.

LE MINOR, L. **Methodes de laboratoire pour l'identification des enterobactéries**. France: Institut Pasteur, 1993.

LE MINOR, L.; POPOFF, M.Y. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. ver., as the type and only species of the genus *Salmonella*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, n. 37, v. 4, p. 465-498, 1987.

LEACH, S.A.; WILLIAMS, A.; DAVIES, A.C.; WILSON, J.; MARSH, P.D.; HUMPHREY, T.J. Aerosol route enhances the contamination of intact eggs and muscle

of experimentally infected laying hens by *Salmonella* Typhimurium DT104. **FEMS Microbiology Letters**, n. 171, p. 203-207, 1999.

LEPAGE, P.; BOGAERTS, J.; VAN GOETHEM, C.; HITIMANA, D.G.; NSENGUMUREMYI, F. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium systemic infection in Rwanda: Clinical features and treatment with cefotaxime. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 26, v. A, p. 53-57, 1990.

LEVINGS, R.S.; LIGHTFOOT, L.; PARTRIDGE, S.R.; HALL, R.M.; DJORDJEVIC, S.P. The genomic Island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in others *S. enterica* serovars. **Journal of Bacteriology**, n. 13, v. 187, p. 4401-4409, 2005.

LIBEANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; CLOUTING, C.; CLIFTON-HADLEY, F.A.; LINDSAY, E.; THRELFALL, E.J.; McDOWELL, S.W.J.; DAVIES, R.H. Multiple genetic typing of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 12, v. 40, p. 4450-4456, 2002.

LINDQVIST, N.; HEINIKAINEN, S.; SIITONEN, A.; PELKONEN, S. Molecular characterization of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium DT 1 isolates. **Epidemiology and Infection**, n. 132, p. 263-272, 2004.

LINDQVIST, N.; HEINIKAINEN, S.; TOIVONEN, A-M.; PELKONEN, S. Discrimination between endemic and feedborne *Salmonella* Infantis infection in cattle by molecular typing. **Epidemiology and Infection**, n. 122, p. 497-504, 1999.

LING, J.; CHAU, P.Y.; ROWE, B. *Salmonella* serotypes and incidence of multiply-resistant *Salmonella* isolated from diarrhoeal patients in Hong Kong from 1973-1982. **Epidemiology and Infection**, n. 99, p. 295-306, 1987.

LING, J.; KOO, I.C.; CHENG, A.F. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium from Hong Kong by ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, n. 33, p. 272-278, 2001.

LOW, J.C.; ANGUS, M.; HOPKINS, G.; MUNRO, D.; RANKIN, C. Antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 isolates and investigation of strains with transferable apramycin resistance. **Epidemiology and Infection**, n. 118, p.97-103, 1997.

MACHADO, J.; BERNARDO, F. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 69, p. 477-480, 1990.

MALORNY, B.; SCHROETER, A.; BUNGE, C.; HOOG, B.; STEINBECK, A.; HELMUTH, R. Evaluation of molecular typing methods for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 isolated in Germany from healthy pigs. **Veterinary Research**., n. 32, p. 119-129, 2001.

MALORNY, B.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. **Antimicrob Agents Chemother**, n. 43, p. 2278-2282, 1999.

MARCUS, S.L.; BRUMELL, J.H.; PFEIFER, C.G.; FINLAY, B.B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**, n. 2, p. 145-156, 2000.

MARIMÓN, J.M.;GOMARIZ, M.; ZIGORRAGA, C.; CILLA, G.; PEREZ-TRALLERO, E. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 10, v. 48, p. 3789-3793, 2004.

MARKOGIANNAKIS, A.; TASSIOS, P.T.; LAMBIRI, M.; WARD, L.R.; KOUREA-KREMASTINOU, J.; LEGAKIS, N.J.; VATOPOULOS, A.C. Multiple clones within multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 3, v. 38, p. 1269-1271, 2000.

MARTIN, L.J.; FYFE, M.; DORÉ, K.; BUXTON, J.A.; POLLARI, F.; HENRY, B.; MIDDLETON, D.; AHMED, R.; JAMIESON, F.; CIEBIN, B.; McEWEN, S.A.; WILSON, J.B. Increased burden of illness associated with antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium infections. **The Journal of Infectious Diseases**, n. 189, p. 377-384, 2004.

MARTINEZ-URTAZA, J.; LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; PEREZ-PIÑEIRO, P.; SACO, M. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from marine environments in coastal waters of Galicia (Spain). **Applied and Environmental Microbiology**, n. 7, v. 70, p. 4030-4034, 2004.

MASLOW, J.N.; SLUTSKY, A.M.; ARBEIT, R.D. Application of pulsed field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In**: Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1993. p.563-572.

McCLELLAND, R.G.; PINDER, A.C. Detection of *Salmonella* Typhimurium in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. **Applied Environmental Microbiology**, n. 60, p. 4255-4262, 1994.

MHAND, R.A.; BRAHIMI, N.; MOUSTAOUI, N.; EL MDAGHRI, N.; AMAROUCH, H.; GRIMONT, F.; BINGEN, E.; BENBACHIR, M. Characterization of extended-spectrum β-lactamase-producing *Salmonella* Typhimurium by phenotypic and genotypic typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 11, v. 37, p. 3769-3773, 1999.

MIKO, A.; PRIES, K.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 6, v. 56, p. 1025-1033, 2005.

MILLEMANN, Y.; LESAGE, M.C.; CHASLUS-DANCLA, E.; LAFONT, J.P. Value of plasmid profile, ribotyping and detection of IS200 for tracing avian isolates of *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Clinical** Microbiology, n. 33, p. 173-179, 1995.

MILLER, M.A. Wildespread emergence in the United States of multiple drug-resistant type of *Salmonella* Typhimurium. **FDA Veterinary**, n. 12, p. 5-6, 1997.

MOHAN, V.P.; SHARMA, K.B.; AGARWAL, D.S.; PURNIMA, G.; PILLAI, P.K. Plasmid profile and phage type of *Salmonella* Typhimurium strains encountered in different regions of India. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, n. 4, v. 18, p. 283-290, 1995.

MOLBAK, K.; BAGGESEN, D.L.; AARESTRUP, F.M.; EBBESEN, J.M.; ENGBERG, J.; FRYDENDAHL, K.; GERNER-SMIDT, P.; PETERSEN, A.M.; WEGENER, H.C. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella* serovar Typhimurium DT104. **The New England Journal of Medicine**, n. 341, p. 1420-1425, 1999.

MULVEY, M.R.; BOYD, D.A.; BAKER, L.; MYKYTCZUK, O.; REIS, E.M.F.; ASENSI, M.D.; RODRIGUES, D.P.; NG, L.K. Characterization of *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type β-lactamase (bla_{OXA-53}) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [aac(6')-I30]. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 54, p. 354-359, 2004.

MURASE, T.; OKITSU, T.; SUZUKI, R.; MOROZUMI, H.; MATSUSHIMA, A.; NAKAMURA, A.; YAMAI, S. Evaluation of DNA fingerprinting by PFGE as na epidemiologic tool for *Salmonella* infections. **Microbiology and Immunology**, n. 39, p. 673-676, 1995.

MURPHY, T.M.; McNAMARA, E.; HILL, M.; ROONEY, N.; BARRY, J.; EGAN, J.; O'CONELL, A.; O'LOUGHLIN, J.; McFADDYEN, S. Epidemiological studies of human and animal *Salmonella* Typhimurium DT104 and DT104b isolates in Ireland. **Epidemiology and Infection**, n. 126, p. 3-9, 2001.

MURRAY, B. E. Resistance of *Shigella*, *Salmonella*, and other select enteric pathogens to antimicrobial agents. **Reviews of Infectious Diseases**, n. 8, v. 2, p. 172-181, 1986.

NASTASI, A.; MAMMINA, C. Epidemiology of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in southern Italy during the years 1980-1994. **Research Microbiology**, n. 147, p. 393-403, 1996.

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: approved standard**. Eighth ed, v. 23, n. 1, 2003.

NETO, J.P. Resíduos de antimicrobianos em alimentos. **Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária**, n. 22, p. 65-71, 2001.

NORWEGIAN ZOONOSIS CENTRE. Trends and sources of zoonotic agents in animals, feeding stuffs, food, and man in Norway 2000. Annual report according to Council Directive 92/117/EEC. Disponível em: <http://www.vetinst.no/zoonosesenteret/zoonosis-centre.htm#report>

NYLEN, G.; FIELDER, H.M.P.; PALMER, S.R. An international outbreak of *Salmonella* Enteritidis associated with lasagne: lessons on the need for cross-national co-operation in investigating food-borne outbreaks. **Epidemiology and Infection**, n. 123, p. 31-35, 1999.

O'BRIEN, T.F.; HOPKINS, J.D.; GILLEEGE, E.S.; MEDEIROS, A.A.; KENT, R.L.; BLACKBURN, B.O.; HOLMES, M.B.; REARDON, J.P.; VERGERONT, J.M.; SCHELL, W.L.; CHRISTENSON, E.; BISSETT, M.; MORSE, E.V. Molecular epidemiology of antibiotic resistance in *Salmonella* from animals and human beings in the United States. **The New England Journal of Medicine**, n. 307, p. 1-6, 1982.

OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 6, v. 37, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, C.J.; CARVALHO, L.F.; FERNANDES, S.A., TAVECHIO, A.T.; MENEZES C.C.; DOMINGUES, F.J.Jr. Antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from slaughter-age pigs and environmental samples. **Microbial Drug Resistance**, n. 8, v. 4, p. 407-411, 2002.

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

OLSEN, J.E.; SKOV, M.N.; ANGEN, O.; THRELFALL, E.J.; BISGAARD, M. Genomic relationship between selected phage types of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium defined by ribotyping, IS200 typing and PFGE. **Microbiology**, n. 143, p. 1471-1479, 1997.

OLSEN, J.E.; SKOV, M.N.; THRELFALL, E.J.; BROWN, D.J. Clonal lines of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis documented by IS200, ribo-, pulsed field gel elctrophoresis and RFLP typing. **Journal of Medical Microbiology**, n. 40, p. 15-22, 1994.

ON, S.L.W; BAGGESEN, D.L. Determination of clonal relationship of *Salmonella* Typhimurium by numerical analysis of macrorestriction profiles. **Journal of Applied Microbiology**, n. 83, p. 699-706, 1997.

OTKUN, M.; ERDEM, B.; AKATA, F.; TATMAN-OTKUN, M.; GERCEKER, D.; YAGCI, S.; OZKAN, E. Antibiotic resistance patters and plasmid profiles of *Salmonella* Typhimurium isolates in Turkey. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, n. 20, p.206-209, 2001.

PARRY, C. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella enterica*. **Current Opinion in Infectious Diseases**, n. 16, v. 5, p. 467-472, 2003.

PARRY, C.; WAIN, J.; CHINH, N.T. Quinolone-resistant *Salmonella* Typhi in Vietnam. **Lancet**, n. 351, p. 1289, 1998.

PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; SADER, H.S. **Molecular biology – PFGE analysis of chromosomal restriction fragments**. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: ASM Press, 1992.

PLATT, D.J.; CHESHAM, J.S.; BROWN, D.J.; KRAFT, C.A.; TAGGART, J. restriction enzyme fingerprint of enterobacterial plasmids: a simple strategy with wide application. **The Journal of Hygiene**, n. 97, p. 205, 1986.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. **Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars**. 6ª rev. WHO Collaborating Center for Reference and Research in *Salmonella*. Institut Pasteur Paris, 2001.

POPPE, C.; SMART, N.; KHAKHRIA, R.; JOHNSON, W.; SPIKA, J.; PRESCOTT, J. *Salmonella* Typhimurium DT104: a virulent and drug-resistant pathogen. **Canadian Veterinary Journal**, n. 39, p. 559-565, 1998.

PRATS, G.; MIRELIS, B.; LLOVET, T.; MUÑOZ, C.; MIRÓ, E.; NAVARRO, F. Antibiotic resistance trends in enteropathogenic bacteria isolated in 1985-1987 and 1995-1998 in Barcelona. **Antimicrobial Agents and Chemother**, n. 44, p. 1140-1145, 2000.

RABATSKY-EHR, T.; WHICHARD, J.; ROSSITER, S.; HOLLAND, B.; STAMEY, K.; HEADRICK, M.L.; BARRET, T.J.; ANGULO, F.J. Multidrug-resistant strains of *Salmonella enterica* Typhimurium, United States, 1997-1998. **Emerging Infectios Diseases**, n. 5, v. 10, p. 795-801, 2004.

RABSCH, W.; TSCHÄPE, H.; BÄUMLER, J. Non-typhoidal salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection**, n. 3, v. 3, p. 237-247, 2001.

RAHMAN, H. Some aspects of molecular epidemiology & characterization of *Salmonella* Typhimurium isolated from man & animals. **The Indian Journal of Medical Reseach**, n. 115, p. 108-112, 2002.

RANGNEKAR, V.M.; BANKER, D.D.; JHALA, H.I. Antimicrobial resistance and incompatibility groups of R plasmids in *Salmonella* Typhimurium isolated from Human sources in Bombay from 1978 to 1980. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.54-58, Jan. 1983.

REFSUM, T.; HEIR, E.; KAPPERUD, G.; VARDUND, T.; HOLSTAD, G. Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates determined by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of isolates from avian wildlife, domestic

animals, and the environmental in Norway. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 11, v. 68, p. 5600-5606, 2002.

REYNA, F.; HUESCA, M.; GONZÁLEZ, V.; FUCHS, Y. *Salmonella* Typhimurium GyrA mutations associated with fluoroquinolone resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 7, v. 39, 1621-1623, 1995.

RIBOT, E.M.; WIERZBA, R.K.; ANGULO, F.J.; BARRET, T.J. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. **Emerging Infectious Diseases**, n. 4, v. 8, p. 387-391, 2002.

RIDLEY, A.M.; THRELFALL, E.J. Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104. **Microbial Drug Resistance**, n. 2, p. 113-118, 1998.

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**, n. 8, v. 36, p. 2314-2321, 1988.

RODRIGUES, D.P. Relatório Anual de Atividades de Monitoramento da resistência Antimicrobiana em Enteropatógenos. **CGLAB/SVS/FUNASA/MS**, 2000.

RODRIGUES, D.P. Relatório Anual de Atividades de Monitoramento da resistência Antimicrobiana em Enteropatógenos. **CGLAB/SVS/FUNASA/MS**, 2001.

RODRIGUES, D.P. Relatório Anual de Atividades de Monitoramento da resistência Antimicrobiana em Enteropatógenos. **CGLAB/SVS/FUNASA/MS**, 2002.

RODRIGUES, D.P. Relatório Anual de Atividades de Monitoramento da resistência Antimicrobiana em Enteropatógenos. **CGLAB/SVS/FUNASA/MS**, 2003.

RODRIGUES, D.P. Relatório Anual de Atividades de Monitoramento da resistência Antimicrobiana em Enteropatógenos. **CGLAB/SVS/FUNASA/MS**, 2004.

RODRIGUES, D.P. Relatório Anual de Atividades de Monitoramento da resistência Antimicrobiana em Enteropatógenos. **CGLAB/SVS/FUNASA/MS**, 2005.

RODRIGUES, D.P. **Surveillance of antimicrobial resistance in bacterial enterophatogens isolated in Brazil**. In: Antimicrobial resistance in the Americas: magnitude and containment of the problem. PAHO/HCP/HCT/163/2000, Washington, D.C.: PAHO/HCP/HCT, 2000. 260p.

ROEDER, B.; CHENGAPPA, M.; NAGARAJA, T.; AVERY, T.; KENNEDY, G. Isolation of *Clostridium perfringens* from neonatal calves with ruminal and abomasal tympany, abomasitis, and abomasal ulceration. **The Journal of the Americam Veterinary Medical Association**, n. 190, p. 1550-1555, 1987.

ROSSI, A.; LOPARDO, H.; WOLOJ, M.; PICANDET, A.M.; MARINO, M.; GALDS, M. Non-typhoid *Salmonella* spp. Resistant to cefotaxime. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**, n. 36, p. 697-702, 1995.

ROWE, B.; THRELFALL, E.J. Drug resistance in Gram negative aerobic bacilli**.** **British Medical Journal**, n. 40, p. 68-76, 1984.

ROWE, B.; THRELFALL, E.J.; WARD, L.R.; ASHLEY, A.S. International spread of multiresistant strains of *Salmonella* Typhimurium phage types 193 and 204 from Britain from Europe. **Veterinary Record**, n. 105, p. 468-469, 1979.

ROZENFELD, S. **Fundamentos da Vigilância Sanitária**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 304p.

SALYERS, A.A.; WHITT, D.D. **Bacterial pathogenesis: a molecular approach**. Washington: AMS Press, 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SANDVANG, D.; AARESTRUP, F.M.; JENSEN, L.B. Characterization of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. **FEMS Microbiology Letters**, n. 160, p. 37-41, 1998.

SANTOS, R.L.; TSOLIS, R.M.; BÄUMLER, A.J.; ADAMS, L.G. Pathogenesis of *Salmonella*-induced enteritis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 36, p. 3-12, 2003.

SANTOS, S.M.; KUPEK, E. Serial outbreaks of food-borne disease in Blumenau, Brazil, caused by *Salmonella* Enteritidis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. 4, p. 275-278, 2000.

SARGUNA, P.; LAKSHMI, V. Neonatal septic arthritis due to *Salmonella* Typhimurium. **Indian Journal of Medical Microbiology**, n. 1, v. 23, p. 66-67, 2005.

SCHIAFFINO, A.; BENZÓN, C.R.; YZZAU, S. Strain typing with IS200 fingerprints in *Salmonella abortusovis*. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 62, p. 2375-2380, 1996.

SCHUMAN, J.D.; ZOTTOLA, E.A.; HARLANDER, K. Preliminary characterization of a food-borne multiple-antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium strain. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 9, v. 55, p. 2344-2348, 1989.

SEKI, L.M. **Estudo retrospectivo da resistência antimicrobiana em *Salmonella* sp isoladas de aves industrializadas em diferentes regiões do país**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2000. 89p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Rio de Janeiro.

SEYFARTH, A.M; WEGENER, H.C.; FRIMODT-MOLLER, N. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subesp. *enterica* serovar Typhimurium from humans and production animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 40, p.67-75, 1997.

SILVA JUNIOR, E.A. **Manual de controle higiênico-sanitário em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1995. 479p.

SCHUMAN J.D.; ZOTTOLA, E.A.; HARLANDER, S.K. Preliminary characterization of a food-borne multiple-antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium strain. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 9, v. 55, p. 2344-2348, 1989.

SOCKET, P.N. Food poisoning outbreaks associated with manufactured foods in England and Wales: 1980-89. **Communicable Diseases Report**, n. 10, v. 1, p. R105-R109, 1991.

SOOD, S.; PETERS, T.; WARD, L.R.; THRELFALL, E.J. Combination of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and single-enzyme amplified fragment length polymorphism (SAFLP) for differentiation of multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. **Clinical Microbiology and Infection**, n. 3, v. 8, p. 154-161, 2002.

SWEDISH ZOONOSIS CENTER. Zoonoses in Sweden up to and including 1999. Disponível em: <http://www.sva.se/static/207.html>

TAUNAY, A.E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. The role of Public Health Laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 38, v. 2, p. 119-127, 1996.

TAUNAY, A.E.; NOVAES, J.R.C.; PESSÔA, G.V.A. Infecções por Enterobactérias no município de São Paulo. Provável disseminação por via aérea. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, n. 31, p. 113-116, 1971.

TAVECHIO, A.T.; FERNANDES, S.A.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 38, p. 315-322, 1996.

TAVECHIO, A.T.; GHILARDI, A.C.; PERESI, J.T.; FUZIHARA, T.O.; YONAMINE, E.K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman souces in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **Journal of Food Protection**, n. 65, v. 6, p. 1041-1044, 2002.

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

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

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with foo-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, n. 56, p. 755-763, 1999.

THRELFALL, E.J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. **FEMS Microbiology Reviews**, n. 26, p.141-148, 2002.

THRELFALL, E.J. Epidemic *Salmonella* Typhimurium DT104: a truly international multiresistant clone. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 46, p. 7-10, 2000.

[A]THRELFALL, E.J.; FROST, J.A. The identification, typing and fingerprinting of *Salmonella*: laboratory aspects and epidemiological applications. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 68, p. 5-16, 1990.

[B]THRELFALL, E.J.; FROST, J.A.; WARD, L.R.; ROWE, B. Plasmid profile typing can be used to subdivide phage-type 49 of *Salmonella* Typhimurium in outbreak investigations. **Epidemiology and Infection**, n. 104, p. 243-251, 1990.

THRELFALL, E.J.; FROST, J.A.; WARD, L.R.; ROWE, B. Epidemic in cattle of *Salmonella* Typhimurium DT104 with chromosomally-integrated multiple drug resistance. **The Veterinary Record**, n. 134, p.577, 1994.

[A]THRELFALL, E.J.; FROST, J.A.; WARD, L.R.; ROWE, B. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella* Typhimurium. **Lancet**, n. 347, p. 1053-1054, 1996.

[B]THRELFALL, E.J.; HAMPTON, M.D.; SCHOFIELD, S.L.; WARD, L.R.; FROST, J.A.; ROWE, B. Epidemiological application of differentiating multiresistant *Salmonella Typhimurium* DT104 by plasmid profile. **Communicable Diseases Report CDR Review**, n. 6, p. R155-R159, 1996.

THRELFALL, E.J.; ROWE, B.; FERGUNSON, J.L.; WARD, L.R. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamycin and apramycin in strains of *Salmonella* Typhimurium phage type 204c isolated in Britain. **The Journal of Hygiene**, n. 3, v. 97, p. 419-426, 1986.

THRELFALL, E.J.; WARD, L.R. Comparison of multiple drug resistence in *Salmonella* from humans and food animals in England and Wales. **Epidemiology and Infection**, n. 111, p.180-197, 1993.

THRELFALL, E.J.; WARD, L.R.; ASHLEY, A.S.; ROWE, B. Plasmid-encoded trimethoprim resistance in multiresistant epidemic *Salmonella* Typhimurium phage types 204 and 193 in Britain. **British Medical Journal**, n. 280, p. 1210-1211, 1980.

THRELFALL, E.J.; WARD, L.R.; ROWE, B. Epidemic spread of a chloramphenicol-resistant strain of *Salmonella* Typhimurium phage type 204 in bovine animals in Britain. **The Veterinary Record**, n. 103, p. 438-440, 1978.

THRELFALL, E.J.; WARD, L.R.; ROWE, B. Spread of multiresistant strains of *Salmonella* Typhimurium phage type 204 and 193 in Britain. **British Medical Journal**, ii, p. 997, 1978.

THORNS, C.J. Bacterial food-borne zoonosis. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, n. 19, p. 229-239, 2000

TIETJEN, M.; FUNG, D.Y.C. Salmonellae and food safety. **Critical Reviews in Microbiology**, n. 21, p. 53-83, 1995.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O.F.; CANDEIAS, J.A.N. **Microbiologia**. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 586p.

TSEN, H.Y.; HU, H.H.; LIN, J.S.; HUANG, C.H.; WANG, T.K. Analysis of the *Salmonella* Typhimurium isolates from food-poisoning cases by molecular subtyping methods. **Food Microbiology**, n. 17, p.143-152, 2000.

TSEN, H.Y.; LIN, J.S.; HSIH, H.Y. Pulsed field gel electrophoresis for animal *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates in Taiwan. **Veterinary Microbiology**, n. 87, p. 73-80, 2002.

VAHABOGLU, H.; DODANLI, S.; EROGLU, C.; OZTURK, R.; SOLEYTIR, G.; YILDIRIM, I. Characterization of multiple-antibiotic-resistant *Salmonella* Typhimurium strains: molecular epidemiology of PER-1-producing isolates and evidence for nosocomial plasmid exchange by a clone. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 34, p. 2942-29466, 1996.

VAHABOGLU, H.; HALL, L.M.C.; MULAZIMOGLU, L.; DODANLI, S.; YILDIRIM, I.; LIVERMORE, D.M. Resistance to extended-spectrum cephalosporins, caused by PER-1 β-lactamase, in *Salmonella* Typhimurium from Istanbul, Turkey. **Journal of Medical Microbiology**, n. 43, p. 294-299, 1995.

VAN DER BOGAARD, A.E.; STOBBERINGH, E.E Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. **International Journal of Antimicrobial Agents**, n. 14, p. 327-335, 2000.

VAN DER WOLF, P.J.; BONGERS, J.H.; ELBERS, A.R.W.; FRANSSEN, F.M.M.C.; HUNNEMAN, W.A.; VAN EXSEL, A.C.A.; TIELEN, M.J.M. *Salmonella* infections in finishing pigs in the Netherlands: bacteriological herd prevalence, serogroup and antibiotic resistance of isolates and risk factors for infection. **Veterinary Microbiology**, n. 67, p. 263-275, 1999.

VAN DUIJKEREN, E.; WANNET, W.J.B.; HOUWERS, D.J.; VAN PELT, W. Serotype and phage type distribuition of *Salmonella* strains isolated from humans, cattle, pigs, and chickens in The Netherlands from 1984 to 2001. **Journal of Clinical Microbiology**, n. 11, v. 40, p. 3980-3985, 2002.

VELING, J.; WILPSHAAR, H.; FRANKENA, K.; BARTELS, C.; BARKEMA, H.W. Risk factors for clinical *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium infection on Dutch dairy farms. **Preventive Veterinary Medicine**, n. 2, v. 54, p. 157-168, 2002.

VIANNA, M.S.R. Vigilância em saúde na cidade do Rio de Janeiro. Secretaria Municipal de Saúde do Município do Rio de Janeiro. Publicado em19/12/2001. Disponível em <http://saude.rio.rj.gov.br>. Acesso em: 06/09/2003.

VIANNA, M.S.R. Legislação de apoio ao controle de zoonoses. Secretaria Municipal de Saúde do Município do Rio de Janeiro. Publicado em 16/04/2003. Disponível em <http://saude.rio.rj.gov.br>. Acesso em: 06/09/2003.

WALL, P.G.; MORGAN, D.; LAMDEN, K.; GRIFFEN, M.; THRELFALL, E.J.; ROWE, B. A case control study of infection with multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in England and Wales. **Communicable Disease Report CDR Review**, n. 4, R130-R135, 1994.

WALKER, R.A.; LINDSAY, E.; WOODWARD, M.J.; WARD, L.R.; THRELFALL, E.J. Variation in clonality and antibiotic-resistance genes among multiresistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage-type U302 (MR U302) from humans, animals, and foods. **Microbial Drug Resistance**, n. 7, p. 13-21, 2001.

WEGENER, H.C.; BAGGESEN, D.L.; GAARSLEV, K. Salmonella typhimurium phage types from human salmonellosis in Denmark 1988-1993. Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, n. 7, v. 102, p. 521-525, 1994.

WHILEY, S.J.; LANSER, J. A.; MANNING, P. A.; MURRAY, C.; STEELE, T.W. Plasmid profile analysis of a salmonellosis outbreak and identification of a restriction and modification system. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 6, v. 54, p. 1591-1594, 1988.

WHITE, D.G.; ZHAO, S.; SUDLER, R.; AYERS, S.; FRIEDMAN, S.; CHEN, S.; McDERMOTT, P.F.; McDERMOTT, S.; WAGNER, D.D.; MENG, J. The isolation of

antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. **The New England Journal of Medicine**, n. 345, v. 16, p. 1147-1154, 2001.

WILSHAW, G.A.; THRELFALL, E.J.; WARD, I.R.; ASHLEY, A.S.; ROWE, B. Plasmid studies of drug resistant epidemic strains of *Salmonella* Typhimurium belonging to phage type 204 and 193. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 6, p. 763-773, 1980.

WINOKUR, P.L.; VONSTEIN, D.L.; HOFFMAN, L.J.; UHLENHOPP, E.K.; DOERN, G.V. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolatas expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 10, v. 44, p. 2777-2783, 2000.

WITTE, W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 4, p. 187-191, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. **Report of a WHO Meeting Germany**, WHO/ECM/ZOO, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Transferable drug resistance in salmonellae in South and Central America. **WHO Weekly Epidemiological Record**, n. 8, p. 65-69, 1974.

WILSON, I.G. Antimicrobial resistance of *Salmonella* in raw retail chickens, imported chicken portions, and human clinical specimens. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p.1220-1225, Jun. 2004.

YANG, S.J; PARK, K.Y.; KIM, S.H; NO, K.M.; BESSER, T.E.; YOO, H.S.; KIM, S.H.; LEE, B.K.; PARK, Y.H. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**, n. 86, p.295-301, 2002.