

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

PLÁCIA BARRETO PRATA GÓIS

APLICAÇÃO DO RAPD (RANDOMLY AMPLIFIED
POLYMORPHIC DNA) PARA TIPAGEM MOLECULAR
DE AMOSTRAS DE *SALMONELLA* ISOLADAS DE
DIVERSAS FONTES DA CIDADE DE ARACAJU-SE

ARACAJU

2006

PLÁCIA BARRETO PRATA GÓIS

APLICAÇÃO DO RAPD (RANDOMLY AMPLIFIED
POLYMORPHIC DNA) PARA TIPAGEM MOLECULAR
DE AMOSTRAS DE *SALMONELLA* ISOLADAS DE
DIVERSAS FONTES DA CIDADE DE ARACAJU-SE

Dissertação apresentada a Universidade
Federal de Sergipe como um dos pré-
requisitos para obtenção do título de
mestre em Ciências da Saúde.

ALEXANDRE LUNA CÂNDIDO

ARACAJU

2006

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Saúde/UFS

G616a	<p>Góis, Plácia Barreto Prata</p> <p>Aplicação do RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) para tipagem molecular de amostras de Salmonella isoladas de diversas fontes da cidade de Aracaju-SE / Plácia Barreto Prata Góis.--Aracaju, 2006. 122 f.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Alexandre Luna Cândido</p> <p>Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, Núcleo de Pós-Graduação e Pesquisa em Medicina.</p> <p>1. Infecção por salmonella 2. Sistemática dos microorganismos 3. Tipagem molecular 4. Microbiologia 5. Infectologia I. Título</p> <p>CDU 579.842.1/.2:616.98</p>
-------	--

PLÁCIA BARRETO PRATA GÓIS

APLICAÇÃO DO RAPD (RANDOMLY AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA) PARA TIPAGEM MOLECULAR DE AMOSTRAS DE *SALMONELLA* ISOLADAS DE DIVERSAS FONTES DA CIDADE DE ARACAJU-SE

Dissertação apresentada como exigência parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde, à comissão julgadora da Universidade Federal de Sergipe.

Aprovada em: 08/05/2006

BANCA EXAMINADORA

Prof^o Dr. Alexandre Luna Cândido
Universidade Federal de Sergipe – UFS

Prof^o Dr. Murilo Marchioro
Universidade Federal de Sergipe - UFS

Prof^o Dr. Edílson Divino de Araújo
Universidade Tiradentes - UNIT

Ao meu esposo e aos meus pais por sempre me apoiarem e vibrarem com minhas conquistas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por sempre se fazer presente iluminando o meu caminho.

Aos meus queridos pais, pelo exemplo de amor infinito e proteção.

Aos meus irmãos pelas lições de vida que compartilhamos juntos.

Ao meu esposo, por ter me compreendido, incentivando-me nas buscas de meus ideais.

Ao meu orientador Professor Alexandre Luna Cândido, que me estendeu seu conhecimento científico e pacientemente atendeu as minhas solicitações.

A Maria Regina Pires Carneiro, pela amizade e ajuda em todos os momentos desta longa caminhada.

A Jefferson Costa e Virgínia (EMBRAPA-SE) por permitirem que este trabalho fosse realizado.

A Dália Rodrigues (Fiocruz-RJ) e Ivano de Fillipis (INCQS-RJ) que possibilitaram o acesso as amostras.

A todos que compõem o Laboratório de Virologia Comparada pelo auxílio na realização deste trabalho.

Aos professores Ângelo Antonioli, Murilo Marchioro e Edílson Divino de Araújo que participaram da minha banca de qualificação dando contribuições importantes para melhoria deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, estiveram presentes nesta caminhada, e de alguma forma contribuíram para realização desta conquista.

Amor é a força da vida e, trabalho vinculado ao amor, é a usina geradora da felicidade.

RESUMO

A infecção por *Salmonella* é um relevante problema de saúde pública, sendo uma das mais importantes causas de patologias entéricas do mundo, com 1,3 milhões de doentes, resultando em aproximadamente 16000 hospitalizações e 600 mortes/ano. A transmissão da *Salmonella spp.* ocorre principalmente através do consumo de água e alimentos contaminados. O diagnóstico é realizado através de testes bioquímicos, sorológicos e moleculares. A técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) é capaz de detectar as variações genéticas presente nos isolados, permitindo a tipagem molecular. Este estudo teve como objetivo realizar a tipagem molecular das amostras de *Salmonella spp.* isoladas de diversas fontes (ostra, frango, água residual, sangue e fezes humanas) utilizando a técnica de RAPD. Foram utilizadas 33 amostras de *Salmonella spp.* da bacterioteca do Laboratório de Virologia Comparada – DMO/CCBS/UFS e duas amostras padrões. Foram utilizados seis *primers* randômicos do Sistema Read-To-Go RAPD, os produtos amplificados foram submetidos à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 5% e corado pela prata. O padrão de bandas observadas foi analisado pelo programa NTSYS. Após análise computacional foi possível discriminar as 35 amostras de *Salmonella spp.*, resultando em 35 padrões de RAPD individuais e distintos, mostrando que as amostras são geneticamente diversas e que existe uma ampla biodiversidade genética nas amostras circulantes em Aracaju-SE. Ao agrupar as amostras de *Salmonella spp.* observou-se o relacionamento epidemiológico entre as amostras humanas e de frango.

PALAVRAS-CHAVE: *Salmonella*; RAPD; Tipagem molecular.

ABSTRACT

The *Salmonella* infection is a relevant problem in the public health, being one of the most important causes of the world's enteric pathologies, with 1,3 million ill people, resulting in 600 deaths/year. The *Salmonella spp.* transmission occurs especially through water consumption and contaminated food. The diagnosis is realized using biochemical, serologic, and molecular tests. The RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) test is able to detect the genetic variation present in the isolated *Salmonella spp.* samples, allowing a molecular typing. This research aimed at achieving molecular typing from *Salmonella spp.* samples isolated from various resources (oyster, chicken, potable water, blood, and human feces) utilizing the RAPD technique. 33 *Salmonella spp.* samples, that came from bacteria located at the Laboratório de Virologia Comparada-DMO/CCBS/UFS, and two standard samples were utilized. Six randomized *primers* were used from the Ready-To-Go System RAPD; the products amplified were submitted to an electrophoretic run in a 5% polyacrilamid gel, and silver dyed. The band standard observed was analyzed by the NTSYS program. After a computational analysis it was possible to discriminate the 35 *Salmonella spp.* samples, resulting in 35 RAPD individual and distinct patterns, showing that the samples are genetically diversified and that there is an ample genetic biodiversity in the circulating samples in Aracaju-SE. To the grouping the *Salmonella spp.* samples was observed the epidemiological relationship between human samples and chicken. KEY-WORDS: *Salmonella*; RAPD; Molecular typing.

LISTA DE FIGURAS

1 Estrutura Química do Lipopolissacarídeo (LPS)	18
2 Fluxograma da análise filogenética pelo programa NTSYS pc 1.70	88
3 Gel dos DNAs controles	89
4 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 1</i>	90
5 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 1</i>	90
6 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 1</i>	91
7 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 2</i>	91
8 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 2</i>	92
9 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 2</i>	92
10 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 3</i>	93
11 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 3</i>	93
12 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 3</i>	93
13 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 4</i>	94
14 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 4</i>	94
15 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 5</i>	95
16 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 5</i>	95
17 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 6</i>	96
18 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o <i>primer 6</i>	96

LISTA DE TABELAS

1 Comparação das técnicas de subtipagem molecular para <i>Salmonella</i>	70
2 Ficha de identificação e origem das amostras	79
3 Relação das amostras estudadas de acordo com o sorotipo e origem	81
4 Perfil RAPD das amostras de <i>Salmonella spp.</i> em relação a cada <i>primer</i>	98

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Características Gerais	16
2.2 Classificação	19
2.3 Fatores de Virulência	22
2.4 Patogenia	27
2.5 Complicações	32
2.6 Mecanismo da Doença	35
2.7 Defesa do Hospedeiro	39
2.8 Epidemiologia	47
2.9 Mecanismos de Transmissão	51
2.10 Diagnóstico	57
2.11 Controle	59
2.12 Tipagem	64
2.12.1 Tipagem Sorológica (Sorotipagem Convencional)	65
2.12.2 Fagotipagem	66
2.12.3 Tipagem Molecular	68
2.12.3.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)	70
2.12.3.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	73
2.12.3.3 Ribotipagem	73
2.12.3.4 PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)	74
2.12.3.5 MLST (Multilocus Sequence Typing)	75
3 OBJETIVOS	77
3.1 Geral	77
3.2 Específicos	77
4 METODOLOGIA	78
4.1 Amostras	78
4.2 Caracterização das Amostras de <i>Salmonella spp.</i>	80
4.3 Obtenção da Biomassa das Amostras de <i>Salmonella spp.</i>	81

4.4 Extração do DNA Total	82
4.5 Reação de RAPD	83
4.6 Ciclo Térmico	84
4.7 Análise dos Produtos Amplificados por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	85
4.8 Coloração dos Géis de Poliacrilamida pelo Método da Prata	85
4.9 Análise dos Dados	86
5 RESULTADOS	89
6 DISCUSSÃO	99
7 CONCLUSÃO	114
REFERÊNCIAS	116
ANEXOS	123

1 INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é um gênero pertencente à família Enterobacteriaceae sendo uma das mais importantes causas de patologias entéricas do mundo. Este gênero subdivide-se em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A *S. enterica* engloba seis subespécies, que por sua vez são classificadas em sorotipos, existindo 2519 sorotipos diferentes (POPOFF; BOCKEMUHL; GHEESLING, 2004).

A transmissão da *Salmonella spp.* ocorre principalmente através de água e alimentos contaminados pelas fezes de homens e de animais. É comumente encontrada no trato gastrointestinal de mamíferos, aves e répteis. Os produtos de origem animal são os principais veículos de transmissão devido à habilidade da *Salmonella spp.* de sobreviver em carnes e produtos de origem animal não cozidos (LINDQUIST, 1998).

Os sorotipos de *Salmonella* causam uma variedade de doenças humanas chamadas Salmoneloses. O alcance da doença varia de gastroenterites leves à forma grave da doença. A severidade da doença depende da virulência da cepa e das condições do hospedeiro humano (HOFER et al., 1997).

A salmonelose resulta da ingestão de células viáveis que colonizam o intestino e produzem enterotoxinas que causam náuseas, vômitos, diarréias e dores abdominais. Os sintomas se iniciam em aproximadamente 12 horas após a ingestão

e permanecem durante 2 ou 3 dias. A doença é geralmente auto-limitada. Existem três formas clínicas da Salmonelose: gastroenterite, febre entérica (forma sistêmica severa) e septicemia (LINDQUIST, 1998).

A gastroenterite é causada pelos sorotipos não-tifoidais, sendo os mais freqüentes a *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*; a febre entérica, pela *S. Typhi* e *S. Paratyphi* e a septicemia, pela *S. Choleraesuis* (GAST, 1997).

Após a infecção, o paciente pode tornar-se portador crônico, com excreção assintomática de *Salmonella spp.* nas fezes durante um ano (GAST, 1997).

O diagnóstico requer o isolamento do microrganismo proveniente de várias fontes. A identificação laboratorial do gênero *Salmonella* é realizada através de testes bioquímicos, e o tipo sorológico é confirmado por testes sorológicos utilizando soros hiperimunes monoclonais soroespecíficos (LINDQUIST, 1998).

A Salmonelose humana constitui um problema de saúde pública de importância mundial, em razão da elevada endemicidade e alta morbidade. A infecção aguda por este patógeno pode levar à hospitalização dos doentes, bem como a seqüelas permanentes como o comprometimento de vários órgãos e até mesmo a morte do indivíduo infectado.

Devido à ampla distribuição de cepas de *Salmonella spp.* causando importantes epidemias, tornou-se relevante caracterizar os isolados de *Salmonella*

spp. para identificação de surtos de infecção, detecção de transmissão cruzada de patógenos nosocomiais, determinação da fonte de infecção, reconhecimento de cepas virulentas e monitoramento de programas de vacinação. A técnica de RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) está sendo utilizada pela sua eficiência, rapidez e flexibilidade. Esta técnica amplifica os fragmentos de DNA a partir de *primers* randômicos, possibilitando a detecção das variações genéticas presentes nos isolados e conseqüentemente, o grupamento das cepas autóctones e emergentes.

A tipagem molecular da *Salmonella spp.* é de grande relevância em estudos epidemiológicos, pois o conhecimento do vínculo genético entre amostras provenientes de diferentes fontes (alimentos, água, amostras clínicas e outros), permite identificação das possíveis fontes de origem do microrganismo para traçar a cadeia de transmissão e difusão ambiental e estabelecer políticas de saúde pública mais eficientes, permitindo um melhor controle sanitário dos produtos oferecidos à população garantindo uma melhoria na qualidade de vida.

A identificação precisa de uma amostra é um ponto crítico para o sucesso de investigações epidemiológicas, que visam à prevenção de surtos de infecção e a erradicação de suas origens. Assim, a exata caracterização do agente é de particular importância para o estabelecimento de correlações entre surtos de salmonelose humana.

A diferenciação inter e intra-sorotipos através de métodos baseados apenas nas propriedades fenotípicas dos mesmos não proporcionam um potencial

de resolução satisfatório. Estes métodos são incapazes de detectar alterações no genoma bacteriano, que podem ocorrer em um mesmo sorotipo via aquisição de plasmídios ou mutações genéticas espontâneas, sem que haja alteração do fenótipo. Conseqüentemente, tais marcadores epidemiológicos têm utilidade limitada para tipagem. Atualmente, técnicas modificadas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) como o RAPD tem demonstrado boa aplicabilidade para estes fins.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características Gerais

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e compreende bacilos Gram-negativos intracelulares facultativos, não-esporulados e não-encapsulados que residem preferencialmente nos macrófagos e requerem uma resposta imune celular e humoral para sua eliminação (KAUFMANN; RAUPACH; FINLAY, 2001). Medem de 0,7-1,5µm de largura por 2,0-5,0µm de comprimento. São bactérias aeróbias, porém com crescimento anaeróbio facultativo, a maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, exceção feita à *S. Pullorum* e à *S. Gallinarum*, que são imóveis (JAY, 1992). Reduzem nitrato a nitrito, fermentam glicose e são oxidase negativa (YAN et al., 2003).

A *Salmonella spp.* não fermentam a lactose (exceto a *S. arizonae*). Certos sorotipos fermentam açúcares específicos e são usados para classificação. A formação de H₂S é usada para diferenciação (JAY, 1992).

O pH ótimo para multiplicação da *Salmonella spp.* é aproximadamente 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são bactericidas. Não toleram concentrações de sal superiores a 4%. O nitrito é inibitório e seu efeito é acentuado pelo pH ácido. A temperatura ideal para multiplicação da *Salmonella spp.* é de 35-37°C, sendo o mínimo de 7°C e máximo de 47°C (JAY, 1992).

A dose infectante é variável, segundo a espécie e o sorotipo envolvido, as adaptadas ao homem possuem dose infectante menor que as não adaptadas. Em geral o número de células necessárias para desencadear os sintomas oscila entre 10^3 e 10^6 UFC/g de alimento para algumas espécies, e entre 10^9 e 10^{11} para outras. Há estudos epidemiológicos nos quais a *Salmonella* Typhimurium, fagotipo 10, pode apresentar dose infectante de somente uma célula, o que justifica ser chamado de tolerância zero nos alimentos para consumo humano (JAY, 1992).

O calor é uma forma eficiente para destruir a *Salmonella* spp. dos alimentos, sendo algumas mais resistentes que outras. A composição do alimento onde a *Salmonella* se encontra é extremamente importante. A presença de sacarose dobra a resistência térmica da *S. Typhimurium*. A presença de água é também importante, sendo que em ambiente úmido a resistência é muito inferior àquela apresentada em ambiente seco. Experimentos conduzidos com ovos desidratados e ovos inteiros indicam que a resistência térmica nos ovos desidratados pode ser de seiscentas vezes maiores do que nos ovos líquidos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A *Salmonella* pode sobreviver no ambiente por longo período de tempo, especialmente onde a temperatura e umidade são altas. Em particular, o organismo pode viver na água e nas fezes por meses. Entretanto, as salmonelas são facilmente destruídas por dissecação e desinfetantes modernos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Igualmente aos outros bacilos Gram-negativos, a parede celular da *Salmonella* contém uma complexa estrutura de lipopolissacarídeo (LPS) que é liberado na lise da célula bacteriana. O lipopolissacarídeo funciona como uma

endotoxina, sendo importante na determinação da virulência do organismo. Este complexo consiste de três regiões estruturais distintas: o antígeno O, core e lipídio A. O antígeno O e core consistem de cadeias de polissacarídeos e o lipídio A é composto de ácidos graxos e fosfatos ligados ao dímero de glicosamina central (Figura 1) (ERNST; GUINA; MILLER, 2001).

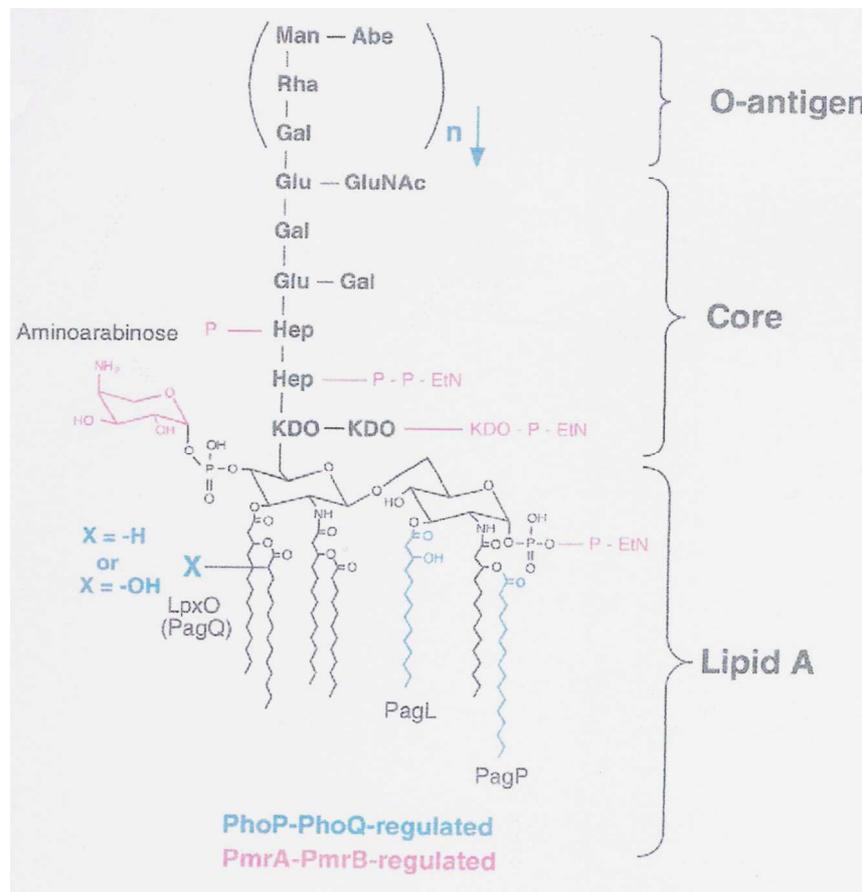


Figura 1 Estrutura química do lipopolissacarídeo (LPS)

Fonte: ERNST; GUINA; MILLER, 2001

O antígeno-O é a região mais variável, podendo conter apenas resíduos de polissacarídeos ou unidades repetidas destes. As salmonelas que não possuem a seqüência completa da unidade repetida de polissacarídeo-O formam colônias ásperas, de aparência rugosa, que são geralmente avirulentas ou menos virulentas

que as cepas lisas, as quais possuem seqüência completa da unidade repetida do polissacarídeo-O. Esta região é responsável pela especificidade do antígeno O e determina a virulência do microrganismo (ERNST; GUINA; MILLER, 2001).

Em resposta ao lipídio A, as células do hospedeiro secretam citocinas e induzem moléculas de adesão que resultam numa ampla resposta imune, incluindo ativação da atividade antimicrobiana dos fagócitos, migração das células do hospedeiro para os sítios de inflamação na tentativa de eliminação da bactéria invasora. O reconhecimento dos lipídios A induz a eliminação da bactéria, entretanto, a produção de citocinas pode resultar numa resposta que geram os sinais e sintomas da doença. Tal resposta inflamatória excessiva, manifestada através de febre e alteração da resistência dos vasos sangüíneos, pode levar ao choque e morte (ERNST; GUINA; MILLER, 2001).

2.2 Classificação

O gênero *Salmonella*, nomeado em 1885 pelo patologista SALMON, é atualmente composto por 2541 sorotipos diferentes (POPOFF; BOCKEMUHL; GHEESLING, 2004).

A classificação da *Salmonella* sofreu algumas modificações ao longo do tempo. Historicamente, a classificação da *Salmonella* foi baseada na epidemiologia, hospedeiro, manifestações clínicas, reações bioquímicas e padrão de antígenos de

superfície. A nomenclatura tornou-se parcialmente confusa porque designações de espécies e sorotipos estavam sendo usadas permutavelmente. No início de 1970, o relacionamento das seqüências nucleotídicas e outras análises moleculares demonstraram que salmonelas típicas foram 85-100% relacionadas, o que é bastante diferente dos outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Por causa do rigoroso relacionamento genético uma única espécie, *Salmonella choleraesuis*, foi inicialmente proposta. Entretanto, em 1999, foi proposto o uso de *Salmonella enterica* para substituir *S. choleraesuis* (YAN et al., 2003).

Duas espécies são atualmente reconhecidas dentro do gênero: *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*. *Salmonella bongori* tem 22 sorotipos que são geralmente isolados de animais de sangue frio ou do ambiente, mas raramente de fontes mamíferas (incluindo humanos), é uma espécie filogeneticamente mais antiga. *Salmonella enterica* contém seis subespécies (I-VI): *S. enterica* subsp. *enterica* (I), *S. enterica* subsp. *salamae* (II), *S. enterica* subsp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* subsp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* subsp. *houtenae* (IV), e *S. enterica* subsp. *indica* (VI) (a subespécie V foi transferida para *S. bongori*) (YAN et al., 2003) (HENSEL, 2004).

Os termos sorotipo e sorovar (ambos podem ser abreviados como ser) têm sido usados, embora uma recente recomendação sugira usar o termo sorotipo ao invés de sorovar (YAN et al., 2003).

Os sorotipos pertencentes a *S. enterica* subsp. *enterica* são designados por um nome geralmente relacionado a localização geográfica onde o sorotipo foi

primeiramente isolado. Este nome é escrito em letras romanas, não itálicas, e com a primeira letra maiúscula. Assim, o sorotipo Enteritidis da subespécie *enterica* é escrito como *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis ou simplesmente abreviado como *Salmonella* Enteritidis. Os sorotipos pertencentes a outras subespécies (II-IV) são designados por sua fórmula antigênica. Por exemplo, *S. enterica* subsp. *salamae* (9,46:z:z₃₉). A subespécie *enterica* é constituída por 1504 sorotipos; *salamae*, 502; *arizonae*, 95; *diarizonae*, 333; *houtenae*, 72 e *indica*, 13 (POPOFF; BOCKEMUHL; GHEESLING, 2004).

A outra classificação é determinada pelo esquema de KAUFMANN & WHITE que divide o gênero em tipos sorológicos de acordo com seus antígenos O (somático), Vi (capsular) e H (flagelar), derivados por reação de aglutinação com anti-soro específico (LINDQUIST, 1998).

O antígeno O está presente na superfície da membrana externa e são determinados por seqüências específicas de polissacarídeos na superfície da célula. O antígeno Vi é um antígeno superficial que sobrepõe o antígeno O, um polissacarídeo capsular encontrado em *S. Typhi* e outras espécies. Os antígenos H são proteínas flagelares, conhecidas por flagelinas, encontradas nas enterobactérias móveis (ERNST; GUINA; MILLER, 2001).

Embora os sorotipos de *Salmonella* sejam relacionados e compartilhem alguns fatores de virulência necessários para a infecção intestinal, diferentes sorotipos podem ter fatores de virulência únicos responsáveis pelos sintomas da doença sorotipo-específicos e preferência ao hospedeiro, enquanto são desprovidos

de fatores críticos para a virulência em outros hospedeiros. Apesar de toda a similaridade o genoma de *Salmonella* revela que cada sorotipo apresenta inserções e deleções relativos a outros sorotipos. Aproximadamente 500-600 kb de DNA cromossomal parece ser único para cada sorotipo, representando 10 a 12% de seu 5 Mb do genoma (EDWARDS; OLSEN; MALOY, 2002).

2.3 Fatores de Virulência

Pelo menos 60 genes são necessários para a virulência da *S. enterica*. A necessidade de muitos determinantes de virulência é um reflexo do complexo ciclo de vida deste patógeno. Os genes de virulência específicos da *Salmonella* residem em várias regiões do cromossomo e freqüentemente codifica determinantes responsáveis pelo estabelecimento de interações específicas com o hospedeiro (GROISMAN; OCHMAN, 1997).

Para ser patogênica, a *Salmonella spp.* deve possuir uma variedade de atributos, estes incluem (1) a habilidade para invadir células, (2) uma camada completa de lipopolissacarídeo, (3) a habilidade de se multiplicar intracelularmente, e (4) a possibilidade de produção de toxinas (CARRAMIÑANA et al., 1997).

A habilidade da *Salmonella* em escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro depende de atributos estruturais e fisiológicos que agem sinergicamente ou independentemente para promover a sobrevivência e crescimento da *Salmonella*

em células do hospedeiro. Tais fatores incluem fímbrias, adesinas, hemaglutininas, polipeptídeos, flagelos, lipopolissacarídeos, sideróforos (aerobactina e enterobactina), porinas, plasmídios de virulência e resistência aos antimicrobianos (R-plasmídios), toxinas (enterotoxinas e citocinas), colicinas e hemolisinas (CARRAMIÑANA et al., 1997).

O reconhecimento da superfície intestinal por adesinas contribui para adaptação dos sorotipos ao hospedeiro. A variedade de adesinas fimbrial expressa por um patógeno determinam quais as estruturas que serão reconhecidas na superfície das células do epitélio intestinal. Novas combinações dos determinantes de adesão gerados através de transferência horizontal de genes e eventos de deleção contribuem para mudança na adaptação ao hospedeiro durante a evolução dos sorotipos (BÄUMLER et al., 1998).

Adesinas de superfície bacteriana codificada por cromossomo, hemaglutininas e polipeptídeos bacterianos necessários para a adesão e invasão pode potencializar o ataque da *Salmonella* nas vilosidades intestinais (CARRAMIÑANA et al., 1997).

As endotoxinas podem desempenhar um papel importante na infecção. Acredita-se que sejam responsáveis pela febre que se desenvolve nos pacientes infectados, embora não se saiba se a febre é resultado direto ou indireto da endotoxina ou da liberação de pirogênicos endógenos dos leucócitos (JOKLIK et al., 1995).

Estudos indicam que a resistência bacteriana aos fatores imunes inato incluindo peptídios antimicrobianos, óxido nítrico e radicais de oxigênio são essenciais para a virulência. A habilidade de remodelar a superfície bacteriana durante a colonização dos tecidos do hospedeiro, por síntese de diferentes lipídios A, é um mecanismo de virulência essencial de todas as bactérias Gram-negativas. Em adição, a resistência a diferentes classes de peptídios antimicrobianos está relacionada com a presença de modificações estruturais específicas no lipídio A. Por exemplo, resistência induzida a polimixina relacionada à adição de aminoarabinose ao lipídio A (ERNST; GUINA; MILLER, 2001).

Alteração na superfície de bactérias Gram-negativas, incluindo redução da superfície, aumento da hidrofobicidade e alteração na composição das proteínas, pode ser considerada um mecanismo geral de sobrevivência dentro dos tecidos do hospedeiro (ERNST; GUINA; MILLER, 2001).

Os genes relacionados com a sobrevivência da *Salmonella* no hospedeiro incluem aqueles envolvidos na biossíntese de componentes estruturais bacterianos como LPS e outras proteínas de membrana, síntese de metabólitos especiais como purinas, pirimidinas, histidina, metionina, AMP cíclico e aminoácidos aromáticos, e na resistência bacteriana aos mecanismos de defesa do hospedeiro, como exemplo os que conferem resistência a defensinas e os que estão envolvidos na resistência ao estresse oxidativo (MASTROENI et al., 2000).

Fatores de virulência podem ser adquiridos através da transferência horizontal de genes e integração ao cromossomo bacteriano, como exemplo, a

inserção de genes de virulência cromossomais chamado de *Salmonella* Pathogenicity Islands (SPI). Dez SPIs tem sido identificados e são comuns em numerosos sorotipos. Estes determinantes e os genes de plasmídios de virulência comuns a muitas cepas, são responsáveis por interações específicas que permitem que a *Salmonella* torne-se adaptada ao hospedeiro e seja um patógeno (YAN et al., 2003).

SPIs acomoda grande grupo de genes que contribuem para um fenótipo particular de virulência, que é geralmente manifestado em um tempo específico durante o curso da infecção. SPI 1 e 6 são requeridos para penetração bacteriana nas células epiteliais do intestino (invasão) por mediar o rearranjo do citoesqueleto de actina, indução do recrutamento de células inflamatórias, secreção de fluidos e para a morte dos macrófagos infectados (HENSEL, 2004) (GROISMAN; OCHMAN, 1997).

SPI 2, 3 e 4 são requeridos para o crescimento e sobrevivência da bactéria no hospedeiro dentro das células fagocíticas, manifestado na fase sistêmica da doença (HENSEL, 2004).

O mecanismo pelo qual SPI-2 estimula o crescimento intracelular está firmemente ligado ao seu papel na prevenção da morte bacteriana dentro dos fagócitos ativados, através da inibição da fusão fagossomo-lisossomo e distribuição da NADPH oxidase (Nicotinamida Adenina Dinucleotídio Fosfato Oxidase) do hospedeiro para o vacúolo contendo *Salmonella* (SCV), ambas as atividades essenciais para o crescimento bacteriano (PORTILLO, 2001).

A NADPH oxidase fagocítica é uma enzima que produz superóxido para a redução do oxigênio molecular e contribui para a atividade microbicida dos neutrófilos, monócitos e macrófagos. Muitos micróbios são sensíveis ao superóxido e seus derivados incluindo o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, coletivamente conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS são diretamente tóxicas para muitos micróbios e a bactéria induz sistemas de reparo de DNA na sua presença para opor-se a sua propriedade mutagênica e usam radicais livres e enzimas para convertê-lo em produtos menos tóxicos (LINEHAN; HOLDEN, 2003).

Em macrófagos com óxido nítrico sintetase ativa (NOS), o superóxido pode reagir com NO (óxido nítrico) para gerar peroxinitrito. Superóxido e óxido nítrico são sintetizados no macrófago infectado, sendo precursor de radicais tóxicos e íons, coletivamente conhecidos como espécies reativas de nitrogênio (RNS) que exercem efeito microbicida e microbiostático (LINEHAN; HOLDEN, 2003).

A distribuição filogenética do SPI-2 difere do SPI-1 em dois aspectos: primeiro, a sequência do SPI-2 são restritas ao gênero *Salmonella*, enquanto o SPI-1 é detectado em outros patógenos bacterianos. Segundo, vários genes do SPI-2 não estão presentes em cepas de *Salmonella bongori*, o mais divergente grupo subespecífico de *Salmonella*, mas são encontrados em todos os seis grupos subespecíficos de *S. enterica* (GROISMAN; OCHMAN, 1997).

SPI 5 media a inflamação o qual caracteriza a fase entérica da doença (MARCUS et al., 2000), SPI-7 codifica o antígeno Vi (exopolissacarídeo capsular –

presente no genoma da *S. Typhi*) (WAIN et al., 2002), SPI-8 codifica uma integrase indicando a mobilidade deste elemento, SPI-9 codifica o Sistema de Secreção Tipo I e SPI-10 é considerado um fator que determina a especificidade ao hospedeiro (HENSEL, 2004).

Os genes de plasmídios de virulência (SPV) promovem a sobrevivência e o rápido crescimento da *Salmonella* nos macrófagos do hospedeiro, aumentando, portanto, a virulência (MARCUS et al., 2000).

Embora não existam evidências do envolvimento dos plasmídios de virulência na patogênese da *Salmonella* não-tifoidal em humanos, os plasmídios são importantes para estes sorotipos causarem infecções sistêmicas em seus hospedeiros específicos (CHIU, LIN; OU, 2000).

2.4 Patogenia

Salmonella sp. pode ser encontrada como um comensal gastrointestinal ou causar infecção por penetração da mucosa e adaptação a habitat extremamente diferente, alcançando desde localizações intracelulares em vários tipos de células ou persistir em biofilmes no cálculo biliar (HENSEL, 2004).

As salmoneloses incluem várias síndromes como gastroenterites, febres entéricas, septicemia, infecções focais e estados de portador assintomático (SANTOS et al., 2001).

A mais comum apresentação clínica é a gastroenterite aguda, com frequência maior em crianças menores de cinco anos de idade. Apresenta-se assintomática na maioria dos adolescentes e adultos (SANTOS et al., 2001).

A gastroenterite induzida pela *Salmonella* é indistinguível das outras causadas por vários patógenos gastrintestinais incluindo as infecções virais. O período de incubação depende da dose infectante e varia entre 6 e 48 horas após a ingestão de alimentos ou água contaminados, o indivíduo desenvolverá náusea, vômito, diarreia, dores abdominais com duração de quatro a sete dias. O tipo de diarreia varia em volume, mas geralmente sem sangue ou muco. Mialgia, dor de cabeça, pirexia, desidratação, febre (38°C a 39°C) e calafrios são comuns. A diarreia é auto-limitada e a febre desaparece entre 2 e 7 dias. A gastroenterite é causada pelos sorotipos não-tifoidais das salmonelas. A infecção é localizada no íleo, cólon e nódulos linfáticos mesentéricos. Biópsia retal revela uma enterite aguda caracterizada por edema da mucosa e inflamação aguda com leucócitos polimorfonucleares. Bacteremia nesta síndrome não é comum e quando ocorre é transitória. Desequilíbrio de fluidos e eletrólitos associada com acidose também ocorre em humanos (SANTOS et al., 2001).

Cerca de 5% dos indivíduos transformam-se em portadores assintomáticos por um tempo considerável. Passam, então, a exercer um importante

papel na disseminação do agente, especialmente se participarem da cadeia de produção e comercialização de alimentos (JAY, 1992).

A febre entérica, também chamada de febre tifóide e paratifóide humana são causadas pela *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, respectivamente e algumas vezes por outros sorotipos dependendo da dose infectante e do estado imune do indivíduo. O período de incubação varia de 5 a 21 dias antes do início da febre, dependendo da dose infectante. Os sintomas desta doença severa são inespecíficos e incluem febre alta (30-100%), anorexia, dor de cabeça (43-90%), mialgia, sintomas gastrintestinais (8-79%), relativa bradicardia (17-50%), esplenomegalia (23-65%) e leucopenia. Os pacientes com febre tifóide sofrem constipação durante os estágios iniciais da infecção, mas aproximadamente um terço dos pacientes desenvolve diarreia, que geralmente desaparece antes do início da doença sistêmica. Exantemas de coloração rósea desenvolve-se sobre o corpo, algumas vezes a bactéria pode ser isolada destas áreas. Os indivíduos infectados também podem apresentar alterações no SNC (Sistema Nervoso Central) como psicose e confusão. O tratamento com antibióticos é necessário através do uso de drogas com alta penetração nos tecidos, o que pode levar a um estado de portador a longo prazo. No entanto, podem ser fatais se antibióticos não forem administrados rapidamente (HUANG; DUPANT, 2005) (SANTOS et al., 2001).

A colonização dos tecidos pelo sorotipo *Typhi* desenvolve trombose capilar nas Placas de Peyer's do íleo terminal o qual pode resultar em hemorragia, necrose (geralmente observada na segunda semana de infecção), ulceração e perfuração intestinal (geralmente observada na terceira semana). Enlargamento dos

nódulos linfáticos mesentéricos, fígado e baço é acompanhado por lesão granulomatosa. Os baixos níveis de bacteremia detectado em muitos pacientes são importantes para a disseminação sistêmica da bactéria, entretanto as endotoxinas não parecem desempenhar um papel importante na patogênese da febre tifóide (SANTOS et al., 2001).

A febre tifóide ocorre em menos que 2,5% dos casos humanos de salmonelose. A prevalência da febre tifóide é estimada em 12-33 milhões de casos, sendo mais comuns em crianças que em adultos (WAIN et al., 2002). A morbidade da febre tifóide é mais severa entre pacientes infectados com imunossupressão, anormalidades no trato urinário e biliar e por infecção com *S. Typhi* resistentes a multidrogas. Complicações ocorrem em 10 a 15% dos pacientes e podem levar a morte (HUANG; DUPANT, 2005).

S. Typhi é restrita aos humanos, não existindo nenhum reservatório animal, sendo comum em áreas tropicais (WAIN et al., 2002).

A febre tifóide é uma doença geralmente encontrada em regiões com superpovoamento e baixas condições sanitárias. A incidência da doença em países industrializados declinou significativamente com a implantação de abastecimento de água limpa, sistemas modernos de esgoto, e mais recentemente, a introdução de vacinas. Contudo, o maior problema era a alta incidência de portadores, indivíduos que tinha recuperado totalmente da doença, mas ainda possuía e liberava os micróbios no ambiente (KAUFMANN; RAUPACH; FINLAY, 2001).

Em algumas ocasiões, dado ao caráter invasivo das salmonelas, pode ocorrer bacteremia, com ou sem focalizações posteriores, podendo afetar qualquer órgão extra-intestinal. A bacteremia é pouco freqüente, oscilando entre 1 e 10%, e 5 a 10% desses pacientes com bacteremia desenvolvem infecções localizadas (YAN, et al. 2003). São considerados grupos de maior risco para sepse os extremos de idade, recém-nascidos, imunodeprimidos e pacientes mal-nutridos (MUÑOZ et al., 1997). A bacteremia por *Salmonella* está associada a uma alta taxa de mortalidade. A mortalidade está relacionada aos extremos de idade, mal-nutrição, presença de choque ou coma, doenças de base, leucopenia e tratamento antimicrobiano inapropriado (ROSANOVA et al., 2002).

Muitos sorotipos invasivos produzem este aspecto da doença, tais como *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis adaptada aos suínos e *Salmonella enterica* sorotipo Dublin adaptada aos bovinos que entram na cadeia alimentar através de produtos de suínos não cozidos ou leite não-pasteurizado, respectivamente (SANTOS et al., 2001).

A síndrome clínica difere da enterite porque as bactérias são freqüentemente isoladas do sangue e a diarreia é observada em apenas um terço dos pacientes infectados. A bacteremia é freqüentemente acompanhada por febre alta que distingue da febre tifóide por ser contínua (SANTOS et al., 2001).

Nos portadores de infecção pelo HIV, a salmonelose é de 20 a 100 vezes mais freqüente do que na população geral, sendo um importante agente de sepse em crianças com HIV (HUANG; DUPANT, 2005).

A presença de malária, principalmente a *falciparum*, aumenta a susceptibilidade para bacteremia por *Salmonella* não-Typhi. Durante a fase aguda da malária ocorre uma imunossupressão transitória da imunidade humoral e deficiências na ativação do complemento que, embora temporária, predispõe a bacteremia por *Salmonella* (HUANG; DUPANT, 2005).

2.5 Complicações

As complicações devido à infecção por *Salmonella* envolvem o Sistema Nervoso Central, sistema cardiovascular, sistema respiratório, osso, articulações, sistema hepatobiliar, sistema genitourinário e outros (HUANG; DUPANT, 2005).

O envolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC) ocorre em 3-35% dos pacientes. As manifestações do SNC incluem encefalopatia, meningite, distúrbios neuromotoras, ataxia, abscesso cerebral, edema cerebral e Síndrome de Guillain-Barré. Os fatores de risco para o envolvimento do SNC incluem endocardites, doença congênita no coração, infecções nos seios paranasais, infecções pulmonares, meningites, ventriculites, trauma, cirurgia e osteomielite do crânio; entretanto, muitos casos não têm nenhum fator de risco conhecido. Estes pacientes freqüentemente apresentam febre, dor de cabeça, vômitos, estado de consciência alterado, papiloedema e déficit neurológico focal nos primeiros dias de febre (HUANG; DUPANT, 2005).

As meningites acometem principalmente neonatos e menores de quatro meses de idade (74%). A transmissão ocorre em surtos epidêmicos de berçários ou através de mãe portadora, doente ou não. É uma doença grave com altas taxas de mortalidade (50%) e seqüelas freqüentes, independentes do uso de antibioticoterapia adequada (HUANG; DUPANT, 2005).

Problemas cardíacos, tais como miocardite e endocardites ocorrem em 1-5% dos casos. Pericardite e arterite ocorrem em menos que 1%. Bacteremia persistente por *S. Typhi* aumenta a probabilidade da bactéria atacar os compartimentos endovasculares, incluindo aneurisma aterosclerótico. Muitos pacientes que desenvolvem complicações cardíacas têm anormalidades cardíacas prévias como alterações vasculares, doença reumática do coração ou defeitos cardíacos congênitos. Estes pacientes apresentam febre, dor no peito, palpitações, fenômenos embolíticos e arritmias cardíacas (HUANG; DUPANT, 2005).

Sintomas respiratórios, tais como tosse, ocorre em 11-86% dos casos. Pneumonia, empiema e fístulas broncopleurais causadas por *S. Typhi* ocorre em 1-6% dos casos. Pacientes com manifestações pulmonares freqüentemente possui anormalidades pulmonares, uma história prévia de infecção pulmonar, anemia falciforme, abuso de álcool, diabetes, ou imunossupressão pelo HIV. Estes pacientes apresentam febre, frio, tosse, dor pleurítica, diarreia e leucopenia (HUANG; DUPANT, 2005).

A osteomielite aparece principalmente em pacientes com anemia falciforme, diabetes, lúpus eritematoso sistêmico, neoplasias, imunodeficiências,

extremos de idade, uso prolongado de corticóides em altas doses, traumas ósseos ou doenças ósseas de base. A freqüência da osteomielite é maior em crianças. Osteomielite causada por *S. Typhi* pode surgir por três possíveis caminhos: disseminação hematogênica, fonte contígua ou como resultado de insuficiência vascular. Das três rotas, a disseminação hematogênica é a mais comum. Os sítios mais comumente infectados são as diáfises de ossos longos tais como úmero proximal, fêmur distal e tíbia distal. Sítios de infecção menos comum incluem a espinha, rádio, ulna, esterno, costela, juntas esternoclavicular, mão, pé e crânio (HUANG; DUPANT, 2005).

A artrite pode ser séptica ou reativa pós-salmonelose. A artrite séptica é, em geral, monoarticular e acomete, principalmente, o joelho. As artrites reativas pós-salmonelose (ou assépticas) têm incidência entre 1 e 2% dos pacientes. Os sintomas têm início duas semanas após o aparecimento da gastroenterocolite. A forma mais freqüente é a poliarticular migratória, porém pode ser monoarticular ou oligoarticular. A artrite reativa é autolimitada e o uso de antiinflamatórios não esteróides costuma ser eficaz (HUANG; DUPANT, 2005).

Infecção esplênica e hepatobiliar também podem ocorrer. Os fatores predisponentes incluem infecções piogênicas, usuário de drogas endovenosas, trauma esplênico, SIDA, disseminação de um processo infeccioso contíguo e hemoglobinopatias. Os pacientes apresentam febre, icterícia, náusea, vômito e dores abdominais. Antes da era antibiótica, abscessos esplênicos causados pela infecção por *Salmonella* ocorriam em aproximadamente 2% dos pacientes. Durante a era antibiótica ocorre em menos que 1% dos casos (HUANG; DUPANT, 2005).

2.6 Mecanismo da Doença

A habilidade da *Salmonella spp.* de causar infecção é dependente de vários fatores incluindo a virulência da cepa e a imunocompetência do indivíduo exposto. A *Salmonella* é capaz de vencer as barreiras específicas e se adaptar ao hospedeiro originando a doença infecciosa (BÄUMLER et al., 1998).

As salmonelas patogênicas ingeridas na comida sobrevivem à passagem através do ácido gástrico, invadem a mucosa do intestino grosso e delgado e produzem toxinas. Invasão das células epiteliais estimula a liberação de citocinas proinflamatórias o qual induz uma reação inflamatória. A resposta inflamatória aguda causa diarreia e pode causar a ulceração e destruição da mucosa. A bactéria pode se disseminar causando doença sistêmica (BÄUMLER et al., 1998).

A *Salmonella* ingerida entra no intestino delgado e, via células M da Placa de Peyer (primeira exposição da Placa de Peyer a *Salmonella*), migra para os nódulos linfáticos mesentéricos onde ocorre a multiplicação. Através da via linfática, as bactérias são liberadas na corrente sangüínea onde elas se disseminam amplamente (bacteremia primária transiente). Esta bacteremia primária é assintomática e a cultura de sangue é geralmente negativa (WAIN et al., 2002). A *Salmonella* é removida do sangue pelos macrófagos dos sinusóides do fígado, baço e medula óssea e pode então se multiplicar nestes sítios dentro de um compartimento delimitado por membrana, o vacúolo contendo a *Salmonella* (SCV) (EVEREST et al., 2001) (BRUMELL et al., 2002). Dentro destas vesículas a bactéria

utiliza o Sistema de Secreção Tipo III para liberar proteínas no citoplasma dos macrófagos (BOISE; COLLINS, 2001). Algumas destas proteínas são quinases, fosfatases e proteínas ligadoras de actina (SANTOS et al., 2003), estas proteínas efetoras interferem na sinalização celular, induzindo o rearranjo do citoesqueleto de actina, enrugamento da membrana e macropinocitose, facilitando a invasão bacteriana (MARCUS et al., 2000) (ANDRADE; ANDRADE JR, 2003).

Através da circulação sistêmica as salmonelas são levadas pelas células do sistema reticuloendotelial que limita e controla a disseminação do organismo. Entretanto, depende do sorotipo e a eficácia da defesa do hospedeiro contra os sorotipos. Alguns organismos podem infectar o fígado, baço, vesícula biliar, ossos, meninges e outros órgãos. Muitos sorotipos são mortos rapidamente nos sítios extraintestinal, e muitas infecções humanas permanecem confinadas no intestino. Quando os nódulos linfáticos mesentéricos são incapazes de conter a infecção, pode ocorrer a sepse (EVEREST et al., 2001).

As salmonelas que sobreviverem à fagocitose ganham acesso ao sistema circulatório causando distribuição sistêmica da bactéria (EVEREST et al., 2001).

Nas infecções por *Salmonella* Typhi (agente da febre tifóide) a bactéria sobrevive aos mecanismos imunes e através do sistema linfático são liberados na corrente sangüínea (bacteremia secundária) para se disseminar aos órgãos ricos em células fagocíticas. A bactéria sobrevive e cresce dentro destes tecidos marcando o início da doença clínica e fim do período de incubação. Durante o estágio sintomático da doença a *S. Typhi* pode ser detectada no sangue, medula óssea e

fezes (WAIN et al., 2002). A habilidade da bactéria de sobreviver dentro dos macrófagos é essencial à patogênese (ERNST; GUINA; MILLER, 2001). Estes organismos são então removidos do sangue no fígado. A infecção por *S. Typhi* da vesícula biliar pode liderar a re-infecção do trato intestinal, com a bactéria localizando nas placas de Peyer do íleo distal (exposição secundária da Placa de Peyer a *S. Typhi*), causando inflamação, ulceração e necrose (úlceras tifóides), podendo ocorrer hemorragia das úlceras durante a terceira semana da doença (EVEREST et al., 2001).

Durante a infecção sistêmica a maioria das salmonelas está associada aos macrófagos e fagócitos polimorfonucleares. Quando altos números bacterianos são alcançados nos tecidos, as salmonelas podem ser vistas em compartimentos extracelulares e em células não-fagocíticas (hepatócitos) (MASTROENI et al., 2000).

O fígado e o baço representam sítios permissivos para a proliferação intracelular de *Salmonella* em casos de doença sistêmica (PORTILLO, 2001).

As células fagocíticas englobam as salmonelas dentro dos fagossomos. Os fagossomos unem-se com os lisossomos formando os fagolisossomos que poderá matar as salmonelas pela acidez, lisozima, peptídeos antimicrobianos e/ou gerarem produtos tóxicos os quais são letais para as células invadidas (BRUMELL et al., 2002).

Alguns patógenos escapam do fagossomo e multiplicam-se no citosol rico em nutrientes, enquanto outros alteram o tráfego do seu nicho vacuolar para evitar

os agentes antimicrobianos. A *Salmonella* é um exemplo desta última estratégia, altera o tráfego endocítico do vacúolo para sobreviver e se multiplicar nas células do hospedeiro durante a doença (BRUMELL et al., 2002).

A sobrevivência intracelular da *Salmonella spp.* está atribuída a vários fatores, incluindo resistência aos metabólitos reativos do oxigênio, inibição da fusão fagossomo-lisossomo, acidificação dos fagolisossomos e resistência aos peptídeos bactericidas tais como a defensina (ISHIBASHI; ARAI, 1996).

Com a proliferação intracelular da *Salmonella* ocorre um aumento médio de 100 vezes no número bacteriano em 24 horas (PORTILLO, 2001).

Após invadir o intestino, muitas salmonelas induzem uma resposta inflamatória aguda, o que pode causar ulceração. Podem também elaborar citotoxinas que inibem a síntese protéica. A invasão da mucosa estimula as células epiteliais a sintetizar e liberar várias citocinas pro-inflamatórias, incluindo IL-1 (Interleucina-1), IL-6, IL-8, TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), IFN- γ (Interferon-gama), MCP-1, e GM-CSF. Isto evoca uma resposta inflamatória aguda que pode também ser responsável por danos ao intestino. Por causa da reação inflamatória intestinal, sintomas de inflamação tais como febre, frio, dores abdominais, leucocitose e diarreia são comuns (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A resposta inflamatória está relacionada com a liberação de prostaglandinas, que estimula a adenilciclase, o que acarreta aumento de secreção de água e eletrólitos, provocando diarreia aquosa (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

A febre é provavelmente causada pela bactéria no sangue liberando LPS, o qual é um poderoso pirogênico e a hepatoesplenomegalia ocorre devido à *Salmonella* ter infectado o baço e fígado e formado microcolônias chamadas de granulomas (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

2.7 Defesa do Hospedeiro

Várias defesas do hospedeiro são importantes na resistência à colonização intestinal e invasão por salmonelas. A defesa do hospedeiro específica e inespecífica são ativas. A defesa inespecífica consiste da acidez gástrica, muco intestinal, motilidade intestinal (peristaltismo), lactoferrina, e lisozima. Defesas específicas consistem de anticorpos sistêmicos e mucosos e resistência genética a invasão (RAUPACH; KAUFMANN, 2001).

As salmonelas ingeridas oralmente geralmente sofrem ação bactericida da lactoperoxidase na saliva humana e a acidez gástrica normal ($\text{pH} < 3.5$) também é letal para as salmonelas. A pequena motilidade intestinal normal protege o intestino por arrastar as salmonelas ingeridas. A vasta quantidade da microbiota normal do intestino pode prevenir a invasão da *Salmonella*. A microbiota normal compete com a *Salmonella* pelos locais disponíveis no intestino e pelos nutrientes. Alteração da flora intestinal anaeróbica pelo uso de antibióticos torna o hospedeiro mais susceptível a salmoneloses. Anticorpos secretórios (IgA) ou mucosos também protege o intestino contra a *Salmonella*. A maior parte do inóculo infectante é

rapidamente eliminada após passagem através do estômago e epitélio intestinal. Somente um pequeno número de microrganismos acessa o sistema fagocítico mononuclear (MPS), nos quais se multiplicam exponencialmente ou induzem apoptose liderando inflamação via citocinas pró-inflamatórias (RAUPACH; KAUFMANN, 2001).

No intestino delgado, as bactérias movem através das células epiteliais e alcançam as células M, penetrando na placas de Peyer. Após o contato com as células M, o agente infeccioso é rapidamente internalizado e alcançam as células apresentadoras de antígeno (APCs), sendo fagocitados e neutralizados (ANDRADE; ANDRADE JR, 2003).

As células fagocíticas controlam o crescimento da *Salmonella* virulenta usando os intermediários reativos do oxigênio (ROI) e os reativos intermediários do nitrogênio (RNI) (MASTROENI et al., 2000).

Entretanto, a *Salmonella spp.* é capaz de sobreviver e se multiplicar dentro das células fagocíticas mononucleares (ANDRADE; ANDRADE JR, 2003).

A *Salmonella* é encontrada dentro das células epiteliais, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos *in vivo*. As células dendríticas servem como veículo para disseminação nos estágios iniciais da infecção (SANTOS; BÄUMLER, 2004).

As bactérias são liberadas do habitat intracelular para a corrente sangüínea. Esta fase de bacteremia da doença é caracterizada pela ampla

disseminação do organismo. Os sítios mais comuns são baço, fígado, medula óssea, vesícula biliar e Placas de Peyer no íleo terminal. No baço, a maioria das bactérias é encontrada dentro dos macrófagos da polpa vermelha e da zona marginal (MASTROENI; SHEPPARD, 2004). No fígado provoca ativação das células de Kupffer, estas células têm alto poder bactericida neutralizando a bactéria com enzimas oxidativas (via óxido nítrico e reativos intermediários do oxigênio) e enzimas ativas em pH baixo. Estas células constituem a mais efetiva barreira contra bactérias invasivas (ANDRADE; ANDRADE JR, 2003).

As células fagocíticas profissionais presentes nos órgãos linfóides como baço, fígado, Placas de Peyer e nódulos linfáticos mesentéricos contêm o crescimento bacteriano e impedem sua disseminação no organismo. A opsonização de sorotipos de *Salmonella* com componentes do complemento é requerida para uma ótima fagocitose pelos macrófagos do hospedeiro (ISHIBASHI; ARAI, 1996). Este mecanismo de defesa limita a infecção bacteriana ao intestino, ao tecido linfóide associado ao intestino e aos nódulos linfáticos mesentéricos. Infecções humanas por *Salmonella* não-tifoidal geralmente desenvolve gastroenterite aguda, mas somente em 1 a 7% dos casos clínicos a bactéria atravessa os nódulos linfáticos mesentéricos e causam bacteremia (BÄUMLER et al., 1998).

As bactérias sobreviventes invadem os hepatócitos e causam alta taxa de morte celular por apoptose. A apoptose ocorre através de quinases ativadas responsáveis por sinais de transmissão ao núcleo. Os hepatócitos produzem TNF- α capaz de amplificar a resposta inflamatória e induzir a morte dos hepatócitos por apoptose (ANDRADE; ANDRADE JR, 2003).

A indução da apoptose associada a bactéria pode não refletir uma resposta do hospedeiro a infecção, mas uma estratégia bacteriana para promover a doença. A morte celular induzida pela *Salmonella spp.* está associada com a fragmentação do DNA e perda da integridade da membrana, sendo, portanto, um evento pro-inflamatório (BOISE; COLLINS, 2001).

As citocinas e a morte dos macrófagos servem para neutralizar a *Salmonella* e auxiliam no seguimento da resposta imune adquirida. As citocinas também estimulam a resposta celular Th1 requerida para a imunidade protetora. A morte dos macrófagos permite a liberação das partículas do compartimento endocítico, sendo processadas pelas células dendríticas resultando na ativação das células TCD8 (KAUFMANN; RAUPACH; FIMLAY, 2001). A resposta imune celular elimina as bactérias dentro dos órgãos infectados (RAUPACH; KAUFMANN, 2001).

Durante a infecção, citocinas como TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-18 e IL-15 impedem o crescimento da *Salmonella* por ativação e recrutamento dos fagócitos inflamatórios para os tecidos (MASTROENI; SHEPPARD, 2004).

Interferon-gama (IFN- γ), produzido inicialmente pelas células NK (Natural Killer) e subseqüentemente pelas células T, é um outro fator do hospedeiro que restringe a proliferação intracelular da *Salmonella* nos estágios iniciais da infecção (primeira semana). Entretanto, esta ação bactericida e bacteriostática falha na eliminação bacteriana nos estágios finais do clareamento bacteriano (PORTILLO, 2001).

O TNF- α age sinergicamente com o IFN- γ na ativação das funções antimicrobianas dos macrófagos e induz a produção de óxido nítrico. Entretanto, o TNF- α não somente participa nos processos imunes protetores, mas também contribui para a imunopatologia e mortalidade no choque séptico mediado por LPS (RAUPACH; KAUFMANN, 2001).

A produção excessiva de TNF- α pelos macrófagos ativados promove a produção de enzimas degradadoras de matriz (matriz metaloproteinases), perda da integridade da mucosa e ulceração (EVEREST et al., 2001).

TNF- α está envolvido primariamente na formação do granuloma, o IFN- γ contribui para a formação do granuloma focal nos tecidos e é crucial para a ativação macrofágica. Ambas IL-12 e IL-18 regulam a produção de IFN- γ pelas células NK e contribui para diminuição da expressão da IL-10. A IL-15 está envolvida na emergência das células NK e a produção do IFN- γ bem como na resistência a infecção (MASTROENI et al., 2000).

O “desvio inflamatório” que acontece quando os leucócitos sangüíneos migram através das células endoteliais para o tecido hepático e esplênico é um outro importante evento. Este fenômeno ocorre através da ação de moléculas de adesão nomeadas de integrinas em células inflamatórias e selectinas em células endoteliais. O microambiente inflamatório é completado por quimiocinas que são capazes de estimular a motilidade dos leucócitos e o movimento direcionado dos neutrófilos e células mononucleares. As quimiocinas ajudam na migração dos leucócitos

sangüíneos para células do hospedeiro infectadas pela bactéria (ANDRADE; ANDRADE JR, 2003).

Somente os sorotipos que causam enterite e diarreia são capazes de induzir a sinalização transepitelial para migração neutrofílica e cepas que não causam diarreia falham em desencadear esta migração transepitelial (SANTOS et al., 2003). Os polimorfonucleares elicitam a secreção de fluidos intestinal (WALLIS; GALYOV, 2000).

Os fagócitos infectados são organizados dentro de um discreto *foco* que se tornam uma lesão patológica, cercada por tecido normal. A formação destas lesões previne a disseminação descontrolada da bactéria no corpo, pois limita a bactéria num foco localizado da infecção. A formação da lesão é um processo dinâmico que requer a presença de moléculas de adesão tais como ICAM-1 e ação balanceada de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-12, IL-18, IL-4 e IL-15 – necessárias para supressão do crescimento bacteriano nos tecidos). Falha na formação das lesões patológicas resulta no crescimento anormal e disseminação da bactéria nos tecidos infectados. Cada foco infeccioso é uma unidade separada que resulta do crescimento clonal de uma bactéria específica (MASTROENI; SHEPPARD, 2004) (MASTROENI et al., 2000).

Nos estágios iniciais da salmonelose, cada foco infeccioso consiste de fagócitos específicos contendo somente uma bactéria. A *Salmonella* cresce nos tecidos e resulta na distribuição das bactérias para células não infectadas e na disseminação dos microrganismos para novos focos infecciosos que se tornam

lesões patológicas. O crescimento bacteriano nos tecidos resulta no aumento do número de células infectadas, com um pequeno número de bactéria por células. O número de lesões aumenta em paralelo com a taxa de crescimento bacteriano, com um pequeno aumento no tamanho das lesões e no número de células infectadas por lesão (MASTROENI; SHEPPARD, 2004).

Não é claro porque são vistas poucas bactérias na maioria dos fagócitos infectados apesar do rápido crescimento bacteriano no organismo. Uma possível explicação é que a *Salmonella* inicia a multiplicação na maioria das células e quando um número limiar de bactérias intracelulares é atingido, ocorre à morte dos fagócitos infectados por necrose ou apoptose e que somente uma pequena porcentagem de fagócitos infectados é permissível ao crescimento bacteriano, a maioria das células não permite a ampla multiplicação bacteriana (MASTROENI; SHEPPARD, 2004).

A infecção primária induz a produção de anticorpos contra determinantes lipopolisacáridicos-LPS (polissacarídeo-O e região core), porinas, outras proteínas de membrana, lipoproteínas, flagelos e fímbrias e outros antígenos protéicos em adição a formação de células T de memória tipo Th1 e resposta T citolítica (CTL) (MASTROENI et al., 2000).

Anti-*Salmonella* IgM aparece no soro nos estágios iniciais da infecção seguida por IgG (MASTROENI et al., 2000).

As células T desempenham um papel crucial nos estágios tardios da infecção primária. Resposta das células T a proteínas de baixo peso molecular,

epítomos flagelares, pilina e também a determinantes lipopolissarídicos (componentes do LPS) também tem sido mostrada, contribuindo para a eliminação bacteriana (MASTROENI et al., 2000).

Os sorotipos da *S. enterica* subespécie I freqüentemente colonizam órgãos internos, esta habilidade de sobreviver e se replicar nas células do sistema reticuloendotelial estão relacionados com sua capacidade de causar doença sistêmica no hospedeiro. Visto que macrófagos de espécies animais distintas diferem amplamente na sua habilidade de neutralizar um sorotipo específico, a adaptação a um novo hospedeiro requer adaptação ao fagócito mononuclear. Por exemplo, *S. Typhi* é capaz de sobreviver nos macrófagos humanos *in vitro*, mas não em macrófagos de murinos, entretanto, *S. Typhimurium* que causa doença sistêmica em ratos sobrevive bem nos macrófagos de murinos, mas não nos macrófagos humanos. Estes dois sorotipos diferem nos mecanismos de internalização bacteriana e no tráfego intracelular dos fagócitos mononucleares em ratos e humanos. Portanto, a habilidade dos sorotipos de causar doença sistêmica é diretamente relacionada à capacidade de sobreviver nos macrófagos do hospedeiro, sendo estes uma importante barreira que restringe a adaptação dos sorotipos a um hospedeiro (BÄUMLER et al., 1998).

Os patógenos que não são específicos a um hospedeiro, tais como *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* tendem a ser associados com doenças em indivíduos mais jovens, sugerindo que não são adaptados a um sistema imune totalmente maduro. Sorotipos que são hospedeiro-específicos, por outro lado, adquiriram habilidade de escapar dos mecanismos de defesa de adultos. Portanto, os sorotipos

hospedeiro-específico tendem a ser mais virulentos apresentando altas taxas de mortalidade (BÄUMLER et al., 1998).

Quando estas defesas do hospedeiro estão ausentes, o hospedeiro torna-se mais susceptíveis a salmonelose. Por exemplo, na SIDA, a infecção por salmonelas é comum, freqüentemente persistente, bacterêmica e resistente ao tratamento prolongado com antibióticos. Recidivas são comuns. O papel da defesa do hospedeiro na salmonelose é extremamente importante (RAUPACH; KAUFMANN, 2001).

2.8 Epidemiologia

Nos Estados Unidos estima-se que ocorra 1,4 milhões de casos de salmonelose não-tifoidal anualmente, e destes 40.000 são confirmados laboratorialmente, aproximadamente mais de quinhentos casos fatais e 2% apresentam artrite crônica como complicação (SANTOS et al., 2003).

A incidência da enterite induzida por *Salmonella* nos Estados Unidos é maior em crianças com menos de um ano de idade com 111 casos por 100.000 habitantes (SANTOS et al., 2001).

No Brasil, em estudo realizado em São Paulo, a *Salmonella* foi a terceira bactéria mais isolada em crianças menores de um ano de idade com diarreia aguda (VERONESI; FOCACCIA, 1999).

Entre os agentes de DTA (Doenças Transmitidas por Alimentos), o gênero *Salmonella* é um dos principais causadores de casos fatais, decorrentes das complicações surgidas entre os pacientes afetados. A taxa de mortalidade situa-se ao redor de 4,1% (JAY, 1992).

O mais alto relato de incidência da febre tifóide é no Sul da Ásia: em Papua Nova Guinéa 1208/100 000 habitantes, e na Indonésia 1000 casos/ 100 000 habitantes. Febre tifóide em regiões endêmicas é mais comum entre os 3 e 19 anos de idade, mas o pico de idade varia regionalmente. Na região Mekong Delta do Vietnã o pico de idade foi entre 5 e 9 anos com uma taxa de 531/100 000 habitantes por ano. Entretanto, na Índia, a febre tifóide foi comum entre crianças mais jovens (1-5 anos) (WAIN et al., 2002).

TSUJI & HAMADA (1999), descreveram no Japão em maio de 1998, um surto causado por *S. Chester* e *S. Oranienburg*, isolados em salgadinhos a base de peixe.

PERESI et al. (1998), descreveram vinte e três surtos provocados por *S. Enteritidis*, durante o período de 1993-1997, na região Noroeste do Estado de São Paulo. O número de pessoas expostas em dezenove deles foi 906, com 295

hospitalizações; verificaram que em vinte e dois surtos a *Salmonella* foi veiculada por alimentos contendo ovos e um por carnes de aves.

De acordo com avaliação feita pela Vigilância Sanitária/SES e Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos/UFRGS sobre surtos de salmonelose no período de 1997-1999, verificou-se exposição de mais de oito mil pessoas, das quais 1.557 foram hospitalizadas, com incidência elevada no período da primavera, sendo a faixa etária mais atingida de 15 a 50 anos; e os principais alimentos envolvidos foram saladas com maionese (BRASIL, 2001).

CAMARGO et al. (1998), relatam que o aumento da incidência de salmonelose no Paraná vem modificando o quadro epidemiológico nos últimos cinco anos. Em 1993 7,1% dos surtos alimentares foram causados por *Salmonella sp.* e 34,0% por *S. aureus*. A partir de 1995 a salmonelose passou a ser a principal DTA notificada; sendo que em 1997, 52,3% dos surtos foram causados por *Salmonella sp.*, contra 42,8% de intoxicação estafilocócica.

MARTINS et al. (1998), relataram a evolução dos surtos de toxinfecções alimentares no Estado de Minas Gerais, no período de 08/1991 à 08/1998. Até 1995 manteve-se o perfil de prevalência para *S. aureus* (65%), com grande envolvimento dos queijos e *Salmonella* com 35% (maionese), destas, 30% foram *S. Enteritidis*. Já em 1996, verificou-se a inversão deste perfil, e o isolamento de *Salmonella* atingiu 68,8% contra 43,8% de *S. aureus*, em 1997, houve permanência deste perfil, verificando uma situação de igualdade em 1998.

CARMO et al. (1990), relataram surto ocorrido em restaurantes de Brasília-DF, com 280 pessoas, sendo a maionese o alimento envolvido, e, os microrganismos isolados foram *Salmonella* Enteritidis e *S. aureus*. Constatou-se que a fonte de contaminação era vários manipuladores portadores de *S. aureus* enterotoxigênicos; e a fonte de *S. Enteritidis* eram ovos utilizados no preparo da maionese.

Hábitos alimentares podem influenciar consideravelmente a epidemiologia das salmoneloses. No Iraque, é comum salmonelose humana causada por leite de ovelha e de búfala, que são consumidos após ligeiro aquecimento e conservação em temperatura ambiente. O consumo de vísceras de animais em determinados países, como China, África do Sul e Israel, tem causado vários surtos de salmoneloses (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

MAGUIRE e cols. (2000) relataram um surto alimentar por *Salmonella* Virchow PT 26 em um hospital privado em Londres em 1994 associado ao consumo de sanduíches de peru preparados por uma cozinheira. Um paciente, nove profissionais, a cozinheira e sua filha apresentaram a infecção, embora mãe e filha tivessem cepas diferentes, ou seja, apresentaram diferente resistência aos antimicrobianos.

UMASANKAR e cols. (1996) descreveram um surto de *Salmonella* Enteritidis após admissão de uma mãe infectada com disseminação secundária a oito outros pacientes em uma maternidade e unidade de cuidados intensivos neonatal por um período de 23 dias. Os alimentos como fontes do surto foram

descartados e objetos contaminados (ressuscitador) no centro cirúrgico foram relacionados ao surto, visto que salmonelas são capazes de sobrevivência prolongada em ambientes e permanecem viáveis durante dias em superfícies não-nutritivas, bem como a disseminação pessoa-pessoa através de mãos contaminadas dos profissionais.

2.9 Mecanismos de Transmissão

A maioria dos casos de infecção por *Salmonella* é esporádica, podendo raras vezes comprovar uma fonte de contágio. Como a *Shigella* e *E. coli* há um predomínio maior no fim do verão e princípio do outono (MUÑOZ et al., 1997).

O principal reservatório natural das salmonelas é o trato intestinal do homem e dos animais. Dentre os animais, as aves são os reservatórios mais importantes, pois podem ser portadoras assintomáticas, excretando continuamente *Salmonella* pelas fezes. Os animais nessas condições podem causar contaminações cruzadas de grande importância nos abatedouros. Suínos, bovinos, eqüinos e animais silvestres (roedores, anfíbios e répteis) também apresentam *Salmonella*. Os animais domésticos (cães, gatos, pássaros) podem ser portadores de salmonelas, representando grande risco de infecção, principalmente para as crianças. A incidência de salmonelas nas fezes de cães normais varia entre 0.6% a 30%, a alta incidência está associada com alta densidade destes animais em regiões de baixos padrões de higiene. Amostras fecais de gatos são menos prováveis conter

salmonelas, a incidência varia de 0 a 14%. Animais infectados pela *Salmonella* são, em sua maioria, assintomáticos (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Ovos, carnes de aves, produtos cárneos e seus derivados são os alimentos que mais comumente, transmitem a *Salmonella* ao homem. Quando estão envolvidos laticínios, há ligação com o consumo de leite cru, leite pasteurizado de forma inadequada e queijos. Casos relacionados ao consumo de ovos e ou derivados, envolvem o consumo de saladas a base de ovos (maionese), sorvetes e outras sobremesas de fabricação caseira, além de produtos de panificação e confeitaria (JAY, 1992).

A *Salmonella* pode se multiplicar rapidamente em comestíveis úmidos mantidos à temperatura ambiente, ou em alimentos congelados e cozidos de forma inadequada, sendo estes, responsáveis pela infecção alimentar (JAY, 1992).

Água poluída com esgoto é uma importante fonte de infecção, pois pode ocorrer a contaminação de peixes e mariscos. Informações na prevalência e na diversidade dos sorotipos de *Salmonella* na superfície da água são essenciais para a epidemiologia e ecologia destas espécies. *Salmonella spp.* são constantemente encontradas em amostras ambientais, por causa dos excretas humanos e de animais de estimação, de fazendas e selvagens. Esgotos municipais, águas correntes de tempestade são as principais fontes deste patógeno em água naturais. A capacidade de sobrevivência das cepas ambientais depende da espécie e fonte de poluição. Tem sido mostrado que a carga bacteriana em rios e áreas costais é

muito importante para a saúde pública e distribuição ambiental (ARVANITIDOU; KANELLOU; VAGIONA, 2005).

A transmissão pessoa-pessoa é mais rara e está presente nas crianças menores, uma vez que não possuem ainda hábitos próprios de higiene e contaminam outras crianças através da transmissão fecal-oral (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Um outro modo de transmissão é através de pessoas portadoras de *Salmonella* com maus hábitos de higiene e que preparam refeições para outras pessoas. Se o membro de uma casa infectar-se, a chance de qualquer outra pessoa da casa se infectar é ao redor de 60% (FRANCO; LANDGRAF, 1996).

Nos últimos anos tem se observado um aumento de incidência da salmonelose causada por *S. Enteritidis*. Este sorotipo zoonótico tem como principal reservatório as galinhas e seu principal veículo de transmissão são os ovos e carnes de frango. Pelo menos três fatores desempenham um papel importante na emergência e transmissão deste sorotipo: o intensivo aumento na produção de ovos e galinhas, o aumento no abastecimento e consumo através de “fast food”, baseado em produtos animais e o rápido crescimento do comércio de alimentos entre países com diferentes níveis de higiene na produção de alimentos humanos e de animais que podem manter diferentes linhagens endêmicas de *S. Enteritidis*. Um problema adicional é a disseminação de *S. Enteritidis* no meio ambiente, o qual pode ocorrer via excreção fecal por humanos e animais e dispersão por esgotos. A *S. Enteritidis* pode sobreviver em águas naturais e, se esta água contaminada for usada em

fazendas ou em indústrias de alimentos a recolonização pode acontecer (LANDERAS; GONZÁLEZ-HEVIA; MENDONZA, 1998).

Este sorotipo tem a peculiaridade de colonizar o canal ovopositor das galinhas, o que causa a contaminação da gema durante a formação do ovo (FRANCO; LANDGRAF, 1996). A matéria fecal eliminada pelas aves, contendo a bactéria, pode contaminar os ovos externamente. Galinhas portadoras de *Salmonella* Enteritidis intestinal assintomática é comum (CARRAMIÑANA et al., 1997).

A existência de fábricas comerciais de aves domésticas operando com milhares de pássaros são ideais para disseminação epidêmica do microrganismo. A contaminação da carne ocorre durante o passo de evisceração, quando a carne entra em contato com o material fecal. Outro ponto de danificação é o resfriamento na venda, onde não são manuseadas em condições higiênicas (KHOODOO; ISSACK; JAUFEERALLY-FAKIM, 2002).

Um levantamento feito na Europa pela WHO (1995) indicou que quase 25% dos surtos alimentares ocorrem por recontaminação. Os fatores mais importantes que contribuíram para a presença de patógenos em alimentos preparados foram a higiene insuficiente (1,6%), contaminação-cruzada (3,6%), processamento ou manutenção em ambientes inadequados (4,2%), contaminação de equipamentos (5,7%) e contaminação por pessoal (9,2%) (REIJ; AANTREKKER, 2004).

Materiais crus contaminados ou ingredientes adicionados aos produtos processados têm sido identificados como fontes de patógenos em várias ocasiões (REIJ; AANTREKKER, 2004).

Equipamentos inadequadamente limpos contendo resíduos de gordura, descascando, quebrados ou com micro-buracos, recipientes usados para transportes de materiais crus não processados, tais como carnes e frangos crus, ovos líquidos não pasteurizados que são subsequentemente usado para processamentos de produtos sem limpeza prévia ou desinfecção inadequada também são fontes de infecção (REIJ; AANTREKKER, 2004).

Um bem reconhecido exemplo de recontaminação em casa são os alimentos prontos para consumo que entram em contato com materiais crus através do uso de tábuas de cortar e utensílios como facas. Pacotes sujos ou defeituosos podem apresentar buracos ou vazamentos que permitem acesso de uma variedade de microrganismos incluindo os patógenos, também sendo responsáveis por permitir recontaminação (REIJ; AANTREKKER, 2004).

O impacto da recontaminação direta de produtos através do ar é frequentemente enfatizada. Insetos, pássaros e roedores tem sido atribuídos a alguns casos. O conhecimento da ecologia microbiana em ambientes ao longo da cadeia alimentar (como durante o processamento, transporte, retalhamento e preparação) é importante para identificar os patógenos e sua possível fonte (REIJ; AANTREKKER, 2004).

Alguns sorotipos são derivados quase que exclusivamente de fontes específicas. Exemplos destes sorotipos são *S. Enteritidis*, que é freqüentemente isolado de ovos, *S. Choleraesuis*, *S. Derby*, *S. Worthington*, *S. Mbandaka* são mais comuns em suínos; *S. Dublin*, em gados; *S. Abortus-equi*, em cavalos; *S. Abortus-ovis* em ovelhas e *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Hadar*, *S. Typhimurium*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Thompson* são os mais comuns em galinhas (YAN et al., 2003) (CARRAMIÑANA et al., 1997).

A adaptação aos hospedeiros de isolados de *Salmonella* variam, alguns sorotipos são patogênicos exclusivamente em humanos (tais como *S. Typhi* e *S. Paratyphi*), enquanto outros sorotipos (tais como *S. Typhimurium* e *S. Newport*) podem afetar múltiplas espécies. A etiologia de casos não-tifoidais humanos é geralmente agrupada em uma dúzia de sorotipos sugerindo que nem todos os sorotipos são patógenos humanos. Potencialmente, mais e mais sorotipos podem ser identificados de pacientes, especialmente entre aqueles que são imunocomprometidos. Um fator chave que define um sorotipo de *Salmonella* como um patógeno de sucesso é a habilidade de sobreviver nas células do hospedeiro e a adaptação a um diverso número de hospedeiros (YAN et al., 2003).

2.10 Diagnóstico

O diagnóstico da salmonelose é realizado através do isolamento e identificação da *Salmonella* em amostras clínicas (fezes e sangue) e dos alimentos suspeitos de terem veiculado a infecção (WAIN et al., 2002).

Após coleta, deve-se pré-enriquecer as amostras em água peptonada 1% ou caldo lactosado a 37°C por 12-24h, para a recuperação de células subletalmente danificadas, e em seguida utilizar caldo de enriquecimento como selenito ou tetracionato, que contêm substâncias inibitórias para suprimir outros grupos de microrganismos, e então, as amostras deverão ser plaqueadas em vários meios seletivos e não-seletivos (sangue, MacConkey, EMB, Bismuto-sulfito, SS, verde-brilhante e Hektoen) para diferenciação da *Salmonella spp.* de outras enterobactérias (WAIN et al., 2002).

A identificação laboratorial do gênero *Salmonella* é realizada através de testes bioquímicos como LIA (lysine-iron Agar), TSI (triple sugar iron Agar) e outros, então a determinação presuntiva é realizada (YAN et al., 2003).

A identificação presuntiva da *Salmonella* é então confirmada pela pesquisa dos antígenos O e H usando anti-soro específico e polivalente. Então, os isolados de *Salmonella spp.* devem ser enviados a um laboratório central de referência para sorotipagem (YAN et al., 2003).

A identificação da *Salmonella* ao nível de gênero não é difícil porque as espécies de *Salmonella* compartilham perfis bioquímicos comuns e possuem altos níveis de similaridade genética. Os sistemas de identificação comercialmente disponíveis são convenientes para identificação do gênero. A determinação da estrutura antigênica permite identificar o organismo e designá-lo no sorogrupo específico (YAN et al., 2003).

O mais comum teste sorológico utilizado é o teste de Widal, o qual detecta anticorpos aglutinantes contra o antígeno O (lipopolissacarídeo) e H (flagelar) de *S. Typhi*. Embora este teste seja amplamente usado, falta sensibilidade e/ou especificidade em regiões endêmicas para febre tifóide quando usados com uma única amostra de soro. Um dos maiores problemas com o desenvolvimento de reagentes para o sorodiagnóstico para a febre tifóide é que a *S. Typhi* apresenta reatividade cruzada com antígenos presentes na flora normal entérica de humanos e com outros patógenos entéricos (WAIN et al., 2002).

Métodos convencionais para detecção de *Salmonella spp.* em alimentos requerem no mínimo 4 dias para obtenção de resultados presuntivos. A necessidade de métodos mais rápidos e simples para detecção de *Salmonella spp.* está crescendo nas indústrias de alimentos e agências governamentais. Nos anos recentes, métodos têm sido desenvolvidos para aumentar a eficiência e velocidade de detecção de microrganismos em alimentos. Relatos indicam a aplicação de PCR (Reação em cadeia da Polimerase) para detectar confiavelmente e rapidamente patógenos em alimentos sendo uma nova e promissora ferramenta diagnóstica para monitorar os alimentos (MIYAMOTO et al., 1998).

2.11 Controle

O controle da diarreia pode e deve ser feito, prioritariamente, pela melhoria na qualidade de vida da população, como suprimento adequado de água limpa, tratamento de esgotos e moradias dignas. Também, noções básicas de higiene, como parte de um programa maior de melhoria do sistema educacional (BLACK, 1993).

Visto que a *S. Typhi* é restrito a seres humanos, nós poderíamos teoricamente eliminar a febre tifóide através da combinação de melhorias sanitárias, melhor diagnóstico (especialmente para identificar portadores) e vacinação em massa. Vacinas têm sido desenvolvidas e por isso a principal barreira para a erradicação é a identificação de casos e portadores. Experiências têm mostrado que a eliminação de *S. Typhi* de uma população local humana elimina a doença da região geográfica local e que a *S. Typhi* não persiste a longo tempo em nenhum reservatório ambiental (WAIN et al., 2002).

Salmonella spp. é difícil de erradicar do ambiente. Por serem as aves domésticas e o gado o maior reservatório das infecções humanas, reduzindo o número de salmonelas nestes animais reduz significativamente a exposição humana. Na Dinamarca, por exemplo, todas as rações animais são tratadas para *Salmonella spp.* antes da distribuição, resultando numa marcada redução em salmoneloses. Outras medidas úteis incluem mudanças na prática de matança animal para reduzir a contaminação cruzada de carcaças de animais, proteção dos alimentos

processados; promover treinamento em práticas de higiene para todas as pessoas que manuseiam alimentos em matadouros e restaurantes, cozinhar e refrigerar alimentos adequadamente; não beber leite não-pasteurizado, lavar as mãos antes das refeições, comprar alimentos de fontes responsáveis, não ingerir alimentos com a data de validade vencida, evitar contaminação cruzada de áreas limpas e sujas ou de alimentos crus e cozidos, prevenção e controle de pragas e a expansão de programas governamentais de vigilância para doenças entéricas (BLACK, 1993).

O controle de *Salmonella* é, portanto, necessário em todos os passos da produção alimentar para garantir produtos seguros para os consumidores (DEL CERRO, et al. 2002).

Programas de vigilância internacionais, nacionais e locais têm sido estabelecidos para monitorar a epidemiologia de surtos e padrões de resistência antimicrobiana para auxiliar no reconhecimento inicial, identificação de fontes e fatores de risco, e investigações oportunas de surtos (YAN et al., 2003).

Portanto, existe uma grande necessidade de ferramentas epidemiológicas baratas, rápida, simples e altamente discriminatória (por exemplo, diferenciação em nível de espécie) para construir programas de controle mais eficientes para *Salmonella* (CHANSIRIPORNCHAI et al., 2000). Os métodos de tipagem molecular têm demonstrado serem uma ferramenta confiável para elucidar a epidemiologia deste patógeno alimentar (BIENDO et al., 2003).

A vacinação é uma poderosa ferramenta para o controle das salmoneloses e o desenvolvimento de uma vacina segura e mais efetiva são necessárias, pois a eficácia das vacinas correntemente disponíveis não é sempre ótima. Vacinas com organismos mortos e vacinas de subunidades foram usadas no passado e continuam sendo amplamente utilizadas com resultados variáveis. Algumas vacinas com organismos mortos são reatogênicas e induz uma pobre resposta imune mediada por células. Entretanto, vacinas de subunidades, tais como uma baseada no polissacarídeo Vi de *S. Typhi*, são protetoras, imunogênicas e são licenciadas para uso humano (MASTROENI et al., 2000).

Vacinas com *Salmonella* morta induzem uma forte resposta de anticorpo, mas desencadeiam uma resposta Th1 insuficiente ou em alguns casos a imunidade tipo Th2. Em animais susceptíveis protegem contra uma nova infecção com doses baixas ou contra cepas menos virulentas. Conferem uma significativa proteção após administração parenteral, mas não se for administrada oral (MASTROENI et al., 2000).

Vacinas vivas atenuadas são capazes de induzir imunidade celular e humoral. Quando vacinas efetivas são usadas, a resistência a re-infecção persiste por longos períodos. Esta imunidade é sorotipo-específica e envolve memória imunológica (MASTROENI et al., 2000).

Vacinas vivas atenuadas são potencialmente superiores a preparações inativadas devido a sua habilidade de induzir imunidade mediada por célula em adição à resposta de anticorpos; distribuição oral com nenhum risco de

contaminação por agulhas; eficácia após administração de dose única; indução de resposta imune em múltiplos sítios mucosos; baixo custo de produção e estocagem e seu possível uso como carreador para distribuição de antígenos recombinantes ao sistema imune (MASTROENI et al., 2000).

O uso de salmonelas vivas atenuadas para distribuir antígenos recombinantes ao sistema imune é uma estratégia atrativa para a construção de vacinas multivalentes. *Salmonella* pode expressar antígenos heterólogos de outros patógenos e pode ser administrada na superfície da mucosa para elicitar uma forte resposta local e uma resposta imune sistêmica. Em muitos casos tem sido demonstrado que as vacinas recombinantes podem fornecer proteção contra salmoneloses e contra os patógenos dos quais os antígenos heterólogos são derivados (MASTROENI et al., 2000).

A *Salmonella* pode transferir plasmídios que codificam antígenos estranhos sob controle de promotores eucarióticos (vacinas de DNA) as APCs, resultando na distribuição do DNA alvo nestas células. A cepa vetora viva, o tipo de mutação selecionado para obtenção da atenuação, a seleção de plasmídios adequados, a expressão apropriada de antígenos estranhos e a eficiência do DNA distribuído são os fatores que parecem serem cruciais na determinação da extensão e da qualidade da resposta imune elicitada (PASETTI; LEVINE; SZTEIN, 2003).

Imunização oral com estas vacinas pode induzir uma resposta de anticorpo na mucosa contra antígenos heterólogos no intestino, saliva e em lavados brônquicos, indicando que a imunização oral pode gerar proteção em sítios mucosos

distantes. Rotas alternativas para imunização das mucosas são as vias intranasal, vaginal ou retal, as quais também induzem resposta humoral (MASTROENI et al., 2000).

Antígenos heterólogos também podem induzir uma resposta de células T específicas (DTH – Hipersensibilidade Tardia, CTL e produção de citocinas). Em muitos casos elicitam resposta de células T tipo Th1 como indicado pela produção de IFN- γ pelas células T e predominância de anticorpos IgG2a antígeno-específico. A resposta celular Th2 com altos níveis de IgG1 antígeno-específico e produção de IL-5 também tem sido relatada (MASTROENI et al., 2000).

De fato, imunização com vacinas para *Salmonella* pode induzir uma resposta imune humoral e celular detectável que nem sempre está relacionada com resistência adquirida a re-infecção (MASTROENI et al., 2000).

Cepas de *S. Typhi* e *S. Dublin* expressam antígeno Vi de superfície que são polissacarídeos imunogênicos. Vacinas baseadas no antígeno Vi são correntemente usadas em humanos. Triagem de campo mostrou que vacinas Vi conferem entre 55 a 75% de proteção contra febre tifóide em áreas endêmicas. A imunogenicidade do antígeno Vi é aumentada quando associada a proteínas tais como a toxina da cólera, toxóide tetânico, toxina da difteria, exoproteína recombinante de *Pseudomonas aeruginosa* e porinas (MASTROENI et al., 2000).

Uma vacina oral tifóide viva atenuada, Ty21a, foi usada de modo geral por muitos anos. Esta vacina tem eficácia moderada em áreas endêmicas, é bem

tolerada, mas requer três a quatro doses para alcançar uma taxa razoável de proteção. Várias vacinas correntemente disponíveis para a prevenção da febre tifóide, não são disponíveis para uso em neonatos e infantes e tem uma eficácia variável. Recentemente resultados encorajadores, tem sido obtido com carreadores de proteínas conjugadas a Vi, aumentando a esperança para nova geração de vacinas tifóides disponíveis para uso geral em infantes (WAIN et al., 2002).

2.12 Tipagem

Métodos de tipagem são utilizados para discriminar entre isolados epidemiologicamente não relacionados pertencentes à mesma espécie microbiana ou taxonomia baseada nas características sorológicas ou moleculares; traçar marcadores epidemiológicos e reconhecer o relacionamento entre isolados derivados do mesmo surto ou cadeia de transmissão, refletindo no fato que os isolados são recentes derivações de uma simples célula ancestral comum. A tipagem está relacionada à estabilidade da cepa e a diversidade nas cepas que formam uma espécie (SOTO et al., 1999).

Epidemiologicamente é importante distinguir os isolados de *Salmonella*, porque a tipagem definitiva dos isolados ajuda a traçar a fonte de um surto e monitorar a tendência à resistência antimicrobiana associada a um tipo particular (YAN et al., 2003).

2.12.1 Tipagem Sorológica (Sorotipagem Convencional)

Sorotipagem de *Salmonella* é o método mais comum para diferenciar cepas que compartilham os mesmos traços fenotípicos. A sorotipagem separa as duas espécies de *Salmonella* em diferentes sorotipos baseadas no antígeno somático (O), capsular (Vi, se presente) e flagelar (H) (YAN et al., 2003).

Para realizar a sorotipagem, uma suspensão do isolado de *Salmonella* é misturado e incubado com um painel de antisoros que reconhecem os epítomos O e H específicos. O perfil da aglutinação gerado é usado para determinar o sorotipo do isolado testado. O esquema de sorotipagem mais usado pela maioria das organizações públicas é o de Kauffmann-White (YAN et al., 2003).

Em muitos laboratórios clínicos e hospitalares, a sorotipagem inicial é realizada usando anti-soro polivalente que permite agrupar os isolados em diferentes sorotipos designados por letras maiúsculas. Por exemplo, *S. Typhimurium* pertence ao grupo B e *S. Enteritidis* ao grupo D (YAN et al., 2003).

Embora seja um método simples e fácil de ser aplicado na prática clínica, pode ser incômodo devido ao caminho sistemático nos quais os organismos devem ser testados por aglutinação com antisoros específicos. E por torna-se caro a manutenção destes antisoros, restringe-se, portanto, a organizações especialistas (HILTON; BANKS; PENN, 1996).

Tem mostrado ser insatisfatório no estudo de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Hadar* e *S. Virchow*, mas é uma técnica muito útil para o estudo de 35 outros sorotipos menos comuns. Portanto, o estudo de certos sorotipos predominantes deve ser complementado com fagotipagem, embora apresente mais alta dificuldade metodológica (RUIZ et al., 2003).

Serotipagem é normalmente inadequado como único método de tipagem para propósitos epidemiológicos por duas razões: antígenos expostos na superfície provêm pequenas informações em relação ao relacionamento genético das cepas pertencentes a diferentes sorotipos; e episódios e surtos de salmonelose humana, tão bem como surtos em bovinos são causados por poucos sorotipos (SOTO et al., 1999).

2.12.2 Fagotipagem

A fagotipagem tem demonstrado ser epidemiologicamente valiosa na diferenciação de cepas de um sorotipo específico, sendo muito utilizada para descrever clones pandêmicos de *Salmonella*, tais como *S. enterica* ser Typhimurium tipo definitivo 104 (DT 104) que causa doença gastrointestinal severa e é tipicamente resistente a múltiplos antimicrobianos (YAN et al., 2003).

A fagotipagem utiliza a habilidade seletiva de bacteriófagos infectarem certas cepas de *Salmonella*, permitindo diferenciar os isolados de acordo com o seu

padrão de lise por diferentes vírus bacterianos (SILVA et al., 2003). Diferentes bacteriófagos são capazes de infectar seletivamente os isolados de *Salmonella* devido a diferenças no fago e no receptor do fago presente na superfície da bactéria. Quando um receptor apropriado de fago é localizado na superfície da célula, o fago infecta a bactéria e causa a lise. A designação do fagotipo é baseada na capacidade do fago de lisar a célula bacteriana (YAN et al., 2003).

Por requerer habilidade técnica e manutenção de múltiplos fagos biologicamente ativos, é geralmente realizada por laboratório de referência e de saúde pública (YAN et al., 2003).

A fagotipagem complementa a sorotipagem, mas também tem limitações em relação à caracterização dos grupos mais freqüentes (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*) que apresenta aproximadamente 60% dos isolados (RUIZ et al., 2003).

Algumas cepas de *S. Enteritidis* têm demonstrado alterar a designação de seu fagotipo por aquisição de certos plasmídios de resistência a drogas e outros, tornando-se não fagotipáveis (HILTON; BANKS; PENN, 1996).

As desvantagens da fagotipagem são: provêm pequenas informações no relacionamento genético entre cepas do mesmo ou de diferentes fagotipos; nem todos os organismos podem ser reconhecidos por fagotipos, algumas cepas mostram uma reação ou padrão lítico que não se ajusta a nenhum fagotipo reconhecido e outros são não tipáveis com os grupos de fagos utilizados; os grupos

de fagos nem sempre estão disponíveis e o método é somente realizado em laboratórios de referência (LANDERAS; GONZÁLEZ-HEVIA; MENDONZA, 1998).

A fagotipagem Vi é a técnica mais comumente usada para diferenciar cepas de *S. Typhi*, apesar de várias desvantagens: demanda habilidade técnica, existe uma significativa proporção de cepas não fagotipadas (Vi degradável), existem algumas cepas Vi negativas e a técnica só pode ser realizada por laboratórios de referência que possuem todas as preparações fago Vi (QUINTAES et al., 2002).

Métodos moleculares para caracterização de *S. Typhi* tem sido desenvolvidos e melhorados para complementar a fagotipagem Vi e permitem a diferenciação de cepas não relacionadas que pertencem ao mesmo fagotipo (QUINTAES et al., 2002), portanto, os métodos moleculares revelam que a coleção é significativamente mais diversa do que o obtido pela fagotipagem (LIN et al., 1996).

2.12.3 Tipagem Molecular

Enquanto os marcadores morfológicos, fisiológicos e bioquímicos em conjunção com a sorologia tradicional são ainda empregados para tipagem, a última década tem visto a introdução e aumento do uso de enzimas de restrição, sondas de DNA e PCR. Cada uma destas técnicas tem aumentado o poder de discriminação e resolução. Portanto, o desenvolvimento de técnicas com a habilidade para

discriminar diferenças em isolados da mesma espécie tem se tornado o maior desafio (LIN et al., 1996).

Utilizando a tipagem molecular, pode-se discriminar cepas de *Salmonella* para identificar as fontes do microrganismo e traçar a cadeia de transmissão e difusão ambiental e implantar medidas de controle (LACONHA et al., 1998). É difícil distinguir um método de tipagem molecular ideal, fácil de realizar, custo-benefício, relativamente rápido, acessível para análises estatísticas e automação, útil para todas as cepas possíveis, reprodutível e caracterizado por um bom equilíbrio entre um mais alto poder discriminatório e aplicabilidade (DE CESARE et al., 2001).

Nos últimos anos, vários métodos de tipagem molecular para *Salmonella spp.* têm sido avaliados, e estes métodos são ferramentas úteis para propósitos epidemiológicos e filogenéticos (SOTO et al., 1999). Estes métodos são baseados na digestão por endonucleases de restrição, amplificação de ácidos nucleicos e seqüenciamento de nucleotídeos (YAN et al., 2003).

Para selecionar o método molecular mais apropriado devem ser considerados diversos fatores como tamanho da amostra, tempo e recursos disponíveis para realização do teste (YAN et al., 2003). A tabela 1 compara alguns aspectos das várias técnicas de tipagem molecular.

Tabela 1. Comparação das técnicas de tipagem molecular para *Salmonella*

Técnicas baseadas na digestão por enzimas de restrição	Discriminação	Reprodutibilidade	Dificuldade técnica	Tempo e Custo
PFGE	Alta	Alta	Alta	Médio
RFLP/Ribotipagem	Média	Alta	Média	Médio
Técnicas baseadas na amplificação (RAPD)	Alta	Baixa	Média	Baixo
Técnicas baseadas no seqüenciamento de nucleotídeos (MLST)	Média/Alta	Alta	Alta	Alta

PFGE: Gel de Eletroforese em Campo Pulsado, RFLP: Polimorfismo nos Fragmentos de Restrição, RAPD: Amplificação Randômica do DNA Polimórfico e MLST: Tipagem por Seqüenciamento Multilocus

Fonte: YAN et al., 2003

2.12.3.1 RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Descrito por WELSH e MCCLELLAND e WILLIAMS em 1990, o RAPD também conhecido como Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction (AP-PCR) é

uma técnica baseada no PCR que tem o potencial para detectar polimorfismo no DNA genômico.

Um ou mais *primers* curtos (10-25 bases) (LIN et al.,1996) escolhidos arbitrariamente capazes de anelar em múltiplos locais do genoma a baixas temperaturas produzem um espectro de produtos amplificados de tamanhos variados característicos do DNA molde (HILTON; BANKS; PENN, 1996).

A amplificação ocorre em baixa estringência, permitindo aos *primers* se anelarem em vários locais das duas fitas do DNA revelando a diversidade genética (QUINTAES et al., 2002).

A seleção de um *primer* apropriado e otimização das condições do PCR é de grande importância para maximizar o poder discriminatório do RAPD (SHANGKUAN; LIN, 1998). Cada primer tem um diferente padrão de produtos de RAPD, cada um com o seu potencial de detectar polimorfismo entre cepas. Portanto, os dados produzidos permitem a diferenciação de cepas relacionadas da mesma espécie (WELSH; MCCLELLAND, 1990).

A ocorrência de eventos genéticos randômicos, incluindo pontos de mutação, inserções e deleções do DNA, pode alterar o padrão de tipagem do RAPD (QUINTAES et al., 2002).

Uma das maiores vantagens do RAPD é que pode ser usado sem conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeo do DNA alvo; um grande número

de *primers* arbitrários pode ser testado para identificar aqueles que são convenientes para aplicações particulares (LIN et al.,1996). Portanto, o RAPD amplifica genomas anônimos com *primers* escolhidos arbitrariamente (HILTON; BANKS; PENN, 1996). E é também barato, reprodutível, rápido e fácil de realizar, no entanto, os resultados podem ser gerados dentro de 4 horas em contraste com outras técnicas, tais como o Southern blot que requer 4 dias (CHANSIRIPORNCHAI et al., 2000), além da facilidade de interpretar os resultados dos perfis de bandas amplificadas (SOTO et al., 1999).

É evidente que o RAPD parece ser promissor não somente para diferenciação inter-sorotipo, mas dependendo do número de *primers* usados, é também apropriado para avaliar o relacionamento genético entre cepas pertencente ao mesmo sorotipo. Entretanto, o poder discriminatório vai depender da seqüência dos *primers* escolhidos (MHAND et al.,1999).

Portanto, no presente, técnicas moleculares podem ser usadas para confirmarem suspeitas epidemiológicas estabelecidas pelos métodos tradicionais. Neste respeito, RAPD destaca-se como uma técnica rápida e econômica a qual é disponível para uso na prática clínica de muitos laboratórios. RAPD junto com a sorotipagem e antibiotipagem são apropriados na prática diária devido a sua simplicidade e alta velocidade para confirmar em um pequeno período se um grupo de isolados são relacionados, permitindo, portanto, implantação de medidas de Saúde Pública necessária para controlar processos infecciosos, sendo um complemento às técnicas tradicionais, já que estas não são suficientemente

discriminatórias no controle de surtos alimentares produzidos por microrganismos (RUIZ et al., 2003).

Reprodutibilidade é a principal desvantagem do RAPD, mas este problema pode ser resolvido trabalhando-se sob as mesmas condições para amplificar e detectar cepas (RUIZ et al., 2003).

2.12.3.2 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

O RFLP utiliza enzimas de restrição para cortar o DNA, o grande número de fragmentos gerados, são separados por eletroforese, em seguida é realizado Southern blot usando sondas para elementos repetidos de DNA (YAN et al., 2003).

A desvantagem da detecção de polimorfismos pelo RFLP em relação ao RAPD é que este requer conhecimento anterior da seqüência do DNA alvo (HILTON; BANKS; PENN, 1996).

2.12.3.3 Ribotipagem

A ribotipagem consiste na amplificação das regiões intergênicas 16S-23S do operon ribossomal *rrn*. A *Salmonella* contém sete operons *rrn* com diferentes

graus de divergência nas seqüências, que são maiores nas regiões 16S-23S que nos genes rRNA. A ribotipagem foca o polimorfismo nas regiões 16S-23S por uma análise direta dos produtos de amplificação após digestão por enzimas de restrição (DEL CERRO et al., 2002).

É um método em que o DNA ribossomal é cortado em pequenos fragmentos por enzimas de restrição. Estes fragmentos são separados de acordo com seu tamanho usando eletroforese em gel de agarose, sendo então transferidos para a membrana e hibridizados com sonda marcada para gerar perfis que são específicos para cada cepa (ERIKSSON et al., 2005).

A desvantagem da ribotipagem em relação ao RAPD é que estas técnicas consomem tempo e demanda de habilidade técnica (QUINTAES et al., 2002).

2.12.3.4 PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

O PFGE é baseado no uso de endonucleases de restrição que corta o DNA genômico em um pequeno número de fragmentos, o qual pode ser separado por gel de eletroforese usando um campo elétrico pulsado (ERIKSSON et al., 2005).

O PFGE separa o DNA sob condições de polaridade alternada permitindo uma resolução dos fragmentos de DNA 20 vezes maior que o obtido pela eletroforese em gel de agarose tradicional. PFGE é reconhecido como sendo

superior aos outros métodos de tipagem molecular para *Salmonella*, sendo, portanto, o método “padrão ouro”. A maior desvantagem deste método em relação ao RAPD é o tempo consumido no processamento das amostras (YAN et al., 2003).

2.12.3.5 MLST (Multilocus Sequence Typing)

Cepas bacterianas freqüentemente sofrem variabilidade na seqüência dos genes específicos, devido a eventos de mutação ou recombinação os quais podem ser utilizados para determinar o relacionamento genético da bactéria. Com o MLST múltiplos genes de um isolado são seqüenciados. Para cada gene, as seqüências diferentes dentro de uma espécie bacteriana são designadas como alelos distintos. Para cada isolado, os alelos de cada locus definem o perfil alélico ou o tipo de seqüência, e os resultados quando comparados com a seqüência de outras cepas são usados para determinar a troca de bases nucleotídicas entre os isolados. Diferenças nucleotídicas nos genes individuais são combinadas e usadas para gerar o tipo de seqüência multilocus, a qual é subsequente utilizada para determinar o relacionamento entre cepas diferentes (YAN et al., 2003).

Muitas espécies bacterianas têm variação suficiente nos genes para proporcionar muitos alelos por locus, permitindo milhões de perfis alélicos distintos usando aquele locus (YAN et al., 2003).

A habilidade discriminatória do MLST para tipagem da *Salmonella* oferece vantagens sobre a sorotipagem e PFGE, alcançando um mais alto poder discriminatório (YAN et al., 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Realizar a tipagem molecular de amostras de *Salmonella spp.* isoladas de diversas fontes utilizando a técnica de RAPD.

3.2 Específicos

- Discriminar os isolados de *Salmonella* inter e intra-sorotipo.
- Verificar o possível relacionamento epidemiológico entre os diferentes isolados.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras

Para a realização do presente estudo foi utilizado 33 amostras de *Salmonella spp.* da bacterioteca do Laboratório de Virologia Comparada – DMO/CCBS/UFS. Estas amostras foram obtidas a partir da análise de água (ambiental e residual), alimentos (ostra e frango) e materiais clínicos (fezes e sangue). Após isolamento e identificação, as amostras foram encaminhadas para sorotipagem no Laboratório de Enteropatógenos da Fundação Osvaldo Cruz – Rio de Janeiro (FIOCRUZ-RJ). Também foram utilizadas amostras de *Salmonella* Enteritidis padrão internacional (ATCC 13.076) e *Salmonella* Thyphimurium (ATCC 13.311), fornecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da FIOCRUZ-RJ (Tabela 2).

Tabela 2 Ficha de identificação e origem das amostras

Nº de Identificação	Sorotipo	Origem
1	S. Tennessee	Ostra
2	S. Houtenae	Água ambiental
3	S. Houtenae	Água ambiental
4	S. Agona	Água ambiental
5	S. Enteritidis	Fezes Humanas
6	S. Agona	Água ambiental
7	S. Enteritidis	ATCC 13.076
8	S. Agona	Água ambiental
9	S. Enteritidis	Fezes Humanas
10	S. Typhimurium	ATCC 13.311
11	S. Enteritidis	Fezes Humanas
12	S. Enteritidis	Fezes Humanas
13	S. Newport	Fezes Humanas
16	S. Typhimurium	Sangue Humano
17	S. Enteritidis	Fezes Humanas
18	S. Enteritidis	Frango
19	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (8,20:64,Z23:-)	Frango
20	S. Panama	Água residual
21	S. Panama	Água residual
22	S. Agona	Água residual
23	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (068:64,Z23:-)	Frango
24	S. Agona	Frango
25	S. Agona	Frango
26	S. Agona	Frango
27	S. Agona	Frango
28	S. Agona	Frango
29	S. Schwarzengrund	Frango
30	S. Schwarzengrund	Frango
31	S. Enteritidis	Fezes Humanas
32	S. Enteritidis	Fezes Humanas
33	S. Panama	Frango
34	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (8,20:64,Z23:-)	Sangue Humano
35	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (8,20:64,Z23:-)	Sangue Humano
36	S. Typhimurium	Sangue Humano
37	S. Enteritidis	Sangue Humano

Fonte: Laboratório de Virologia Comparada, DMO/CCBS/UFS

4.2 Caracterização das Amostras de *Salmonella* spp.

As 35 amostras de *Salmonella* spp. foram obtidas de diversas fontes, sendo 11 amostras de frango; 1 de ostra; 5 de água ambiente, 3 de água residual, 8 de fezes, 5 de sangue humano e pertenciam a 10 diferentes sorotipos, a saber: 9 *Salmonella* Agona, 3 *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:Z4,Z23:-), 1 *S. enterica* subsp. *enterica* (068:Z4,Z23:-), 10 *S. Enteritidis*, sendo 1, a ATCC 13.076, 2 *S. Houtenae*, 1 *S. Newport*, 3 *S. Panama*, 2 *S. Schwarzengrund*, 1 *S. Tennessee* e 3 *S. Typhimurium*, sendo 1, a ATCC 13.311. Na tabela 3, as amostras estão agrupadas de acordo com sorotipo e origem.

A amostra de ostra e as 11, de frango, foram provenientes do Mercado Central da Cidade de Aracaju-SE, das 5 amostras de água ambiente, 2 foram da água do Rio Sergipe e 3, do Rio do Sal e as 3 amostras de água residual foram da Lagoa de Sedimentação do Roza Elze, as 8 amostras de fezes humanas e as 5, de sangue humano, foram obtidas de diversas clínicas e hospitais da cidade de Aracaju-SE.

Tabela 3 Relação das amostras estudadas de acordo com o sorotipo e origem

N° de amostras	Sorotipo	Origem
1	<i>S. Tennessee</i>	Ostra
2	<i>S. Houtenae</i>	Água ambiental
4	<i>S. Agona</i>	Água ambiental
3	<i>S. Agona</i>	Frango
1	<i>S. Agona</i>	Água residual
7	<i>S. Enteritidis</i>	Fezes Humanas
1	<i>S. Enteritidis</i>	Sangue Humano
1	<i>S. Enteritidis</i>	Frango
1	<i>S. Newport</i>	Fezes Humanas
2	<i>S. Typhimurium</i>	Sangue Humano
2	<i>S. Panama</i>	Água residual
1	<i>S. Panama</i>	Frango
2	<i>S. Schwarzengrund</i>	Frango
2	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (8,20:64,Z23)	Sangue Humano
1	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (8,20:64,Z23)	Frango
1	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (068:64,Z23)	Frango
1	<i>S. Enteritidis</i>	ATCC 13.076
1	<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 13.311

Fonte: Laboratório de Virologia Comparada, DMO/CCBS/UFS

4.3 Obtenção da Biomassa das Amostras de *Salmonella* spp.

As amostras foram semeadas em placas contendo ágar SS (*Salmonella-Shigela*) e incubadas a 37°C por 24h. Após crescimento em placa foi preparado o pré-inóculo a partir de uma única colônia em tubos contendo 5mL de Caldo Luria Bertani (Caldo LB - 10g de tripton, 5g de extrato de levedura, 10g de NaCl, 1000mL água destilada, pH 7,4) sendo incubados sob agitação (120rpm) a 37°C por 12 horas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

O conteúdo de cada tubo (5mL) foi transferido para um balão contendo 1000mL de Caldo LB, sendo então, incubados a 37⁰C sob agitação (120rpm) por 12 horas (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Os conteúdos dos balões foram centrifugados a 8000rpm por 20 minutos a 4°C. Os sedimentos foram ressuspensos em 10mL de Tampão Salina Fosfatada pH 7.2 (PBS).

4.4 Extração do DNA Total

Para extração do DNA total foram centrifugados 1,5mL da suspensão bacteriana em PBS (pH 7.2) a 10000rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensado em 450µL de Tris-EDTA pH 8.0 (TE). Para lise, as células foram incubadas a 56°C em banho-maria durante 3h numa solução de 20µL de Proteinase K (20mg/mL), 2µL de RNase (10mg/mL) e 30µL de uma solução de Dodecil Sulfato de Sódio a 10% (SDS), e posteriormente, inativadas a 70°C por 10 minutos. Após inativação, as amostras foram centrifugadas a 6000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, a partir do qual foi realizada a extração do DNA genômico. Foi acrescentado igual volume (500µL) de fenol: clorofórmio tamponado, as amostras foram homogeneizadas cuidadosamente e em seguida, centrifugadas a 6000rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, esse procedimento foi realizado 4 vezes, sendo então, acrescentado 1/10V (50µL) de solução de Acetato de Potássio – KOAc (60mL de 5M de KOAc,

11,5mL de ácido acético glacial e 28,5mL de água destilada) e 2V (1000 μ L) de etanol 95%. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido por 20 minutos e centrifugadas a 12000rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento (DNA) foi deixado secar a temperatura ambiente; em seguida, ressuspenso em 50 μ L de água ultra-pura (UP) e diluído 1:100 (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

4.5 Reação de RAPD

Para a reação de RAPD foram utilizados os seis oligonucleotídeos iniciadores sintéticos fornecidos pelo sistema “Ready-To-Go RAPD Analysis Beads” da Amersham Biosciences, a saber: iniciador 1, 5'-GGTGCGGGAA-3'; iniciador 2, 5'GTTTCGCTCC-3'; iniciador 3, 5'-GTAGACCCGT-3'; iniciador 4, 5'-AAGAGCCCGT-3'; iniciador 5, 5'-AACGCGCAAC-3' e iniciador 6, 5'-CCCGTCAGCA-3'.

A reação foi constituída de 2,5 μ L de tampão PCR (30mM de KCl e 10mM de Tris-HCl pH 8.3), 0,75 μ L de MgCl₂ (3mM), 16,9 μ L de água DEPEC, 3 μ L de primer (15pmol), 0,6 μ L de dNTPs (0,4mM), 0,25 μ L de Taq DNA polimerase (0,25U) e 1 μ L de DNA molde, obtendo-se um volume final de 25 μ L. A mistura dos componentes foi centrifugada brevemente a 3.000rpm para coletar os componentes no fundo do tubo. A reação foi coberta com 50 μ l de óleo mineral e submetida aos ciclos térmicos.

Para otimizar as condições de amplificação do RAPD foi realizado ensaios com diferentes quantidades de *primer* (5µl e 3µl) e temperaturas de anelamento (35°C e 40°C), visando melhor visualização dos produtos amplificados. Também foram utilizados diversos controles para avaliar as condições de amplificação do teste, os DNAs controles usados foram o de *E. coli* BL21 e C1a e ATCC 13.076 e ATCC 13.311.

Para verificar a reprodutibilidade do RAPD, 10% das amostras foram analisadas em duplicata.

4.6 Ciclo Térmico

As amplificações foram realizadas em um termociclador Thermo Hybaid PCR Sprint. Antes dos ciclos, as amostras foram submetidas à desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos. Foi adotado o esquema conhecido como *hot start* (ERLICH; GELFAND; SNINSKY, 1991), no qual todos os componentes da reação foram adicionados, exceto a *Taq DNA polimerase* que só foi incluída após a desnaturação inicial, quando a temperatura encontrava-se a 80°C. Cada ciclo constou de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 35°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos. Após 40 ciclos, uma extensão final foi realizada durante 5 minutos a 72°C.

4.7 Análise dos Produtos Amplificados por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

O produto amplificado foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 5% recomendado para análise de fragmentos entre 80 – 500 nucleotídeos (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). O gel de poliacrilamida foi constituído por 4,98mL da solução de acrilamida a 30%, 0,21mL de persulfato de amônio (APS) a 10%, 6mL de Tris-borato-EDTA (TBE) 5X, 25µL de N',N',N',N'-tetrametilenodiamino (TEMED) e 18,81mL de água UP.

Após a polimerização do gel foi realizada uma pré-corrída eletroforética em TBE 1X a 112 Volts durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 5µL do tampão de corrida *blue orange* ao produto amplificado e aplicados 4µL no gel, bem como o padrão de peso molecular com escala de 100bp (100bp DNA ladder, Promega). A corrida eletroforética foi realizada a 112 Volts durante 3 horas em tampão TBE 1X.

4.8 Coloração dos Géis de Poliacrilamida pelo Método da Prata

Após a corrida eletroforética, os géis de poliacrilamida foram corados pela prata. Inicialmente foi realizada a fixação em uma solução de 12mL de ácido acético glacial, 50mL de etanol, 50µL de formaldeído a 37% e água UP para 100mL durante

1h. Em seguida, os géis foram lavados 3 vezes durante 20 minutos em uma solução de 50mL de etanol e 50mL de água ultra pura. Para o desenvolvimento da cor, os géis foram incubados durante 1 minuto em uma solução contendo 0,1g/L de tiosulfato de sódio. Em seguida, foram lavados 3 vezes durante 2 segundos em água UP. Para impregnação, os géis foram incubados durante 20 minutos em uma solução de nitrato de prata (0,1g de nitrato de prata, 70µL de formaldeído a 37% e água UP para 100mL) durante 20 minutos. Após a impregnação os géis foram lavados durante 20 segundos em água UP. Para revelação, os géis foram incubados durante 10 minutos em uma solução com 3g de carbonato de sódio, 50µL de formaldeído a 37%, 100µL de uma solução contendo 0,1g/L de tiosulfato de sódio e água UP para 100mL e em seguida, foram lavados por 20 segundos em água UP e finalmente, para bloquear a reação os géis foram incubados em 50mL de EDTA 0,1M.

Os produtos amplificados visualizados nos géis foram analisados de acordo com a similaridade ou divergência entre as amostras.

4.9 Análise dos Dados

Para análise do nível de diversidade e relacionamento genético dos diversos sorotipos foram realizadas comparações entre perfis produzidos nos géis por cada *primer*. Inicialmente, foi construída uma matriz de valores binários, registrando-se a presença (1) ou ausência (0) de bandas das diferentes amostras,

sendo consideradas apenas as bandas que não deram margem a dúvidas, como as fracamente visíveis e as de difícil resolução.

A matriz foi submetida a um programa de análise estatística multivariada para determinação das distâncias genéticas entre os sorotipos.

Os coeficientes de similaridade foram obtidos empregando-se o coeficiente de similaridade de Jaccard. Esse coeficiente de similaridade mede o grau de concordância entre duas unidades e é dado pela fórmula $S_{(J)} = a/a + b + c$. O valor de **a** corresponde ao número de bandas presentes nas amostras 1 e 2; **b** é o número de bandas presentes na amostra 1 e ausente na 2; **c** é o número de bandas presentes na amostra 2 e ausente na 1. Portanto, **a** representa o número de concordâncias positivas, enquanto **b** e **c** representam as discordâncias. O coeficiente de coincidência mede o grau de concordância entre as amostras, levando-se em conta as concordâncias positivas.

Após obtenção dos coeficientes de similaridade foi construído um dendograma que evidenciou o agrupamento dos sorotipos, utilizando o programa NTSYSpc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versão 1.70 que emprega o método UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method Using Average”) (ROHLF, 1992).

O processo de agrupamento envolve basicamente duas etapas: a primeira relaciona-se com a medida de similaridade (ou dissimilaridade) entre as unidades taxonômicas, e a segunda, com a adoção de uma técnica de agrupamento, a

formação do grupo. A técnica de agrupamento hierárquico permite que as unidades sejam agrupadas por um processo que se repete em vários níveis, até que seja estabelecido um dendograma, como representado na Figura 3.

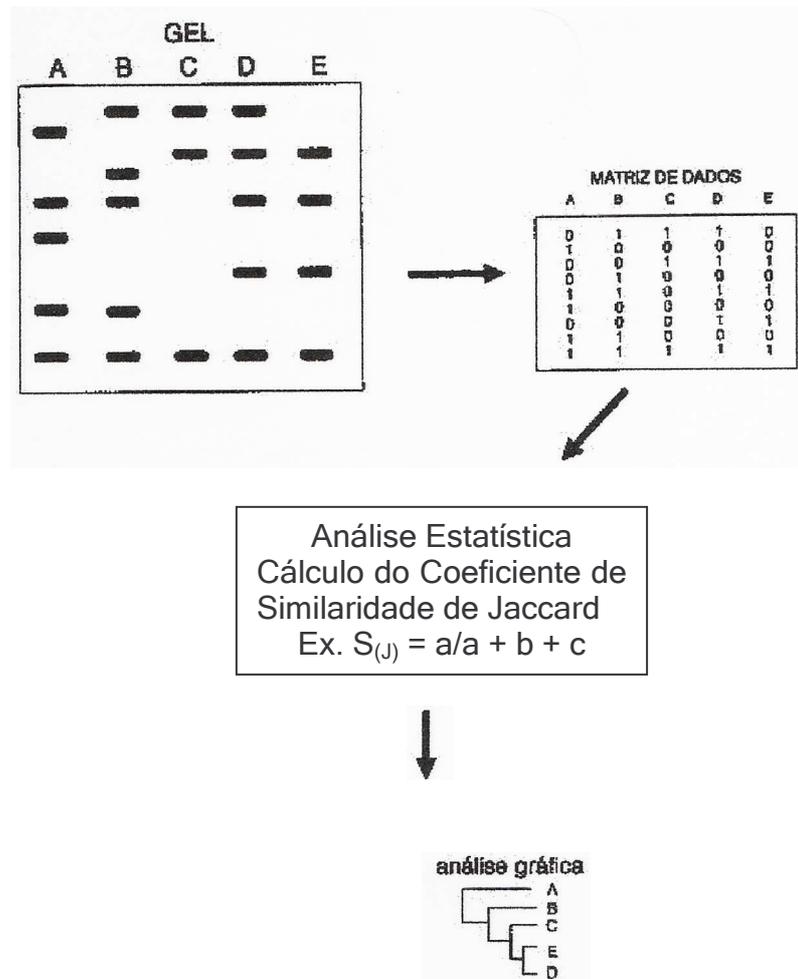


Figura 2 Fluxograma da análise filogenética pelo programa NTSYS pc 1.70

5 RESULTADOS

A metodologia empregada para a extração do DNA total, forneceu um DNA de boa qualidade e com quantidade suficiente para permitir a visualização dos fragmentos amplificados pela técnica de RAPD.

A garantia das boas condições de amplificação do teste foi obtida a partir dos DNAs controles de *E. coli* BL21 e C1a e ATCC 13.076 e ATCC 13.311, utilizando-se o *primer 2* (Figura 3).

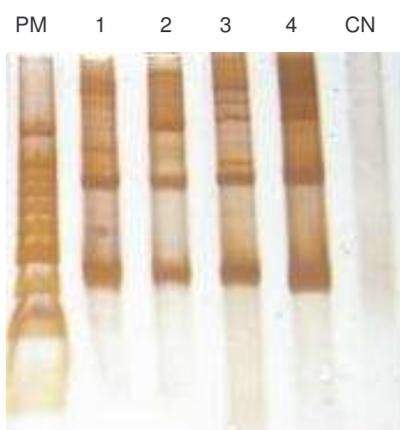


Figura 3 Gel dos DNAs controles.

PM = Peso Molecular (100bp),
1 = BL21, 2 = C1a, 3 = ATCC 13.076,
4 = ATCC 13.311, CN = Controle Negativo

As amostras foram analisadas a partir das amplificações obtidas por cada *primer* individualmente.

Os fragmentos obtidos utilizando o *primer* 1 variaram de 329 a > 1500 bp com uma média de 8 bandas, variando de 5 a 14 bandas, nenhuma banda foi comum a todos os isolados (Figuras 4, 5 e 6).

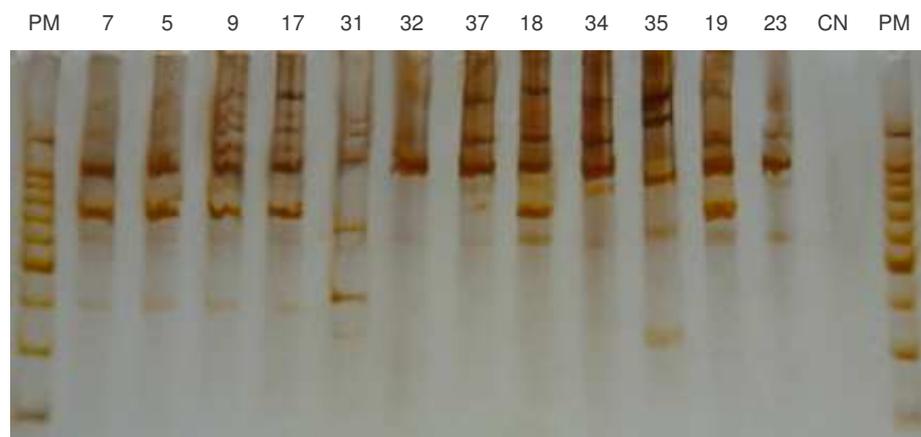


Figura 4 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer* 1. PM = Peso Molecular (100bp), CN = Controle Negativo.

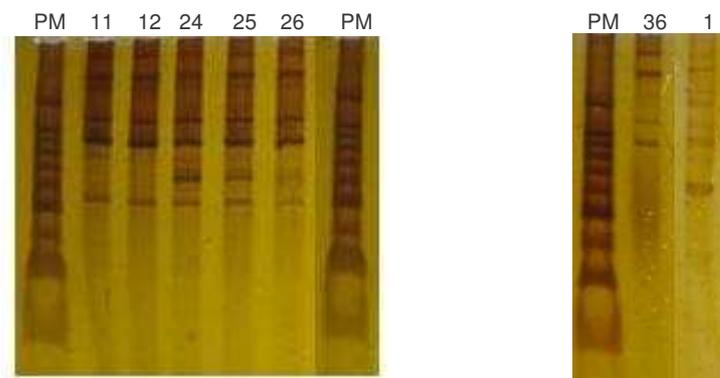


Figura 5 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer* 1. PM = Peso Molecular (100bp).

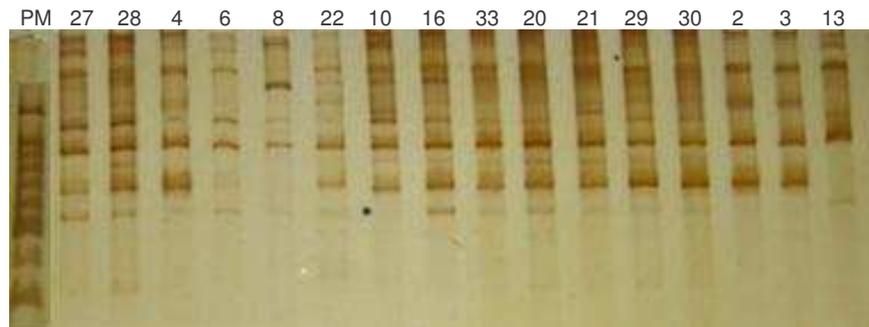


Figura 6 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 1*. PM = Peso molecular (100bp).

O tamanho dos fragmentos amplificados obtidos das 35 amostras de *Salmonella spp.* com o *primer 2* variaram de 140 a > 1500 bp, sendo que o número de bandas por isolado variou de 1 a 15, com uma média de 8 bandas, nenhuma banda foi comum a todos os isolados (Figura 7, 8 e 9).

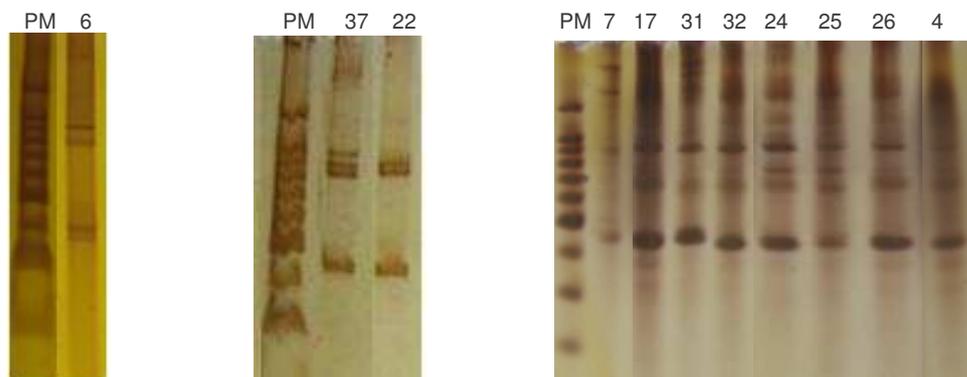


Figura 7 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 2*. PM = Peso Molecular (100bp).

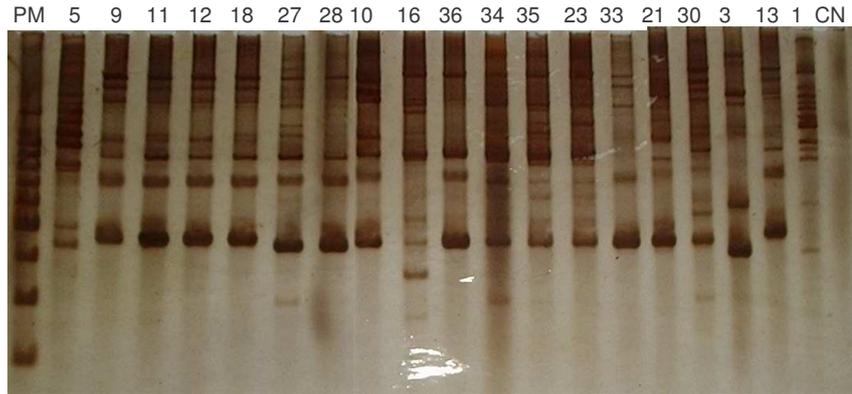


Figura 8 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 2*. PM = Peso Molecular (100bp).

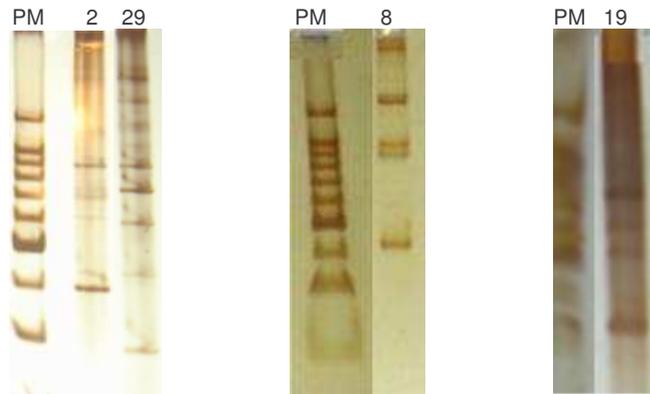


Figura 9 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 2*. PM = Peso Molecular (100bp).

O tamanho dos fragmentos obtidos utilizando o *primer 3* variou de 300 a > 1500 bp, sendo que cada amostra apresentou de 2 a 8 bandas, com uma média de 4 bandas, nenhuma banda foi comum a todos os isolados (Figuras 10, 11 e 12).

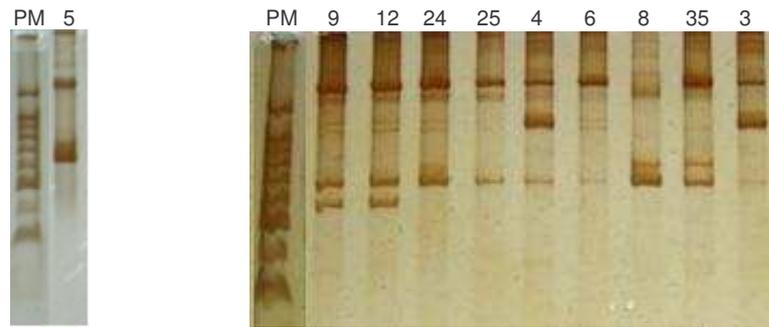


Figura 10 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 3*. PM = Peso Molecular (100bp).

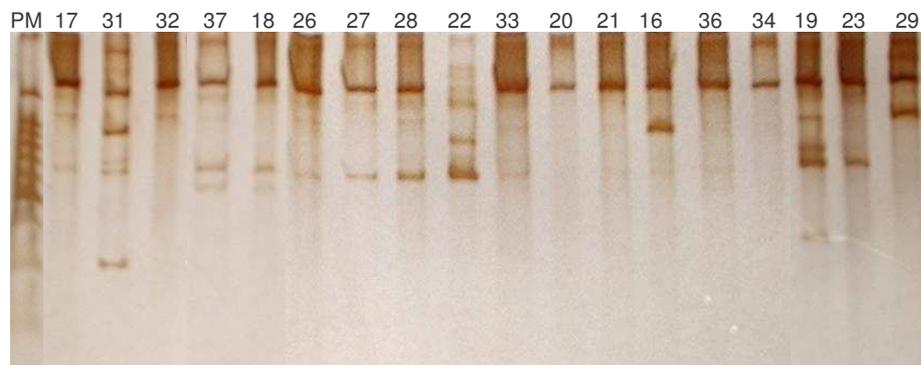


Figura 11 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 3*. PM = Peso Molecular (100bp).

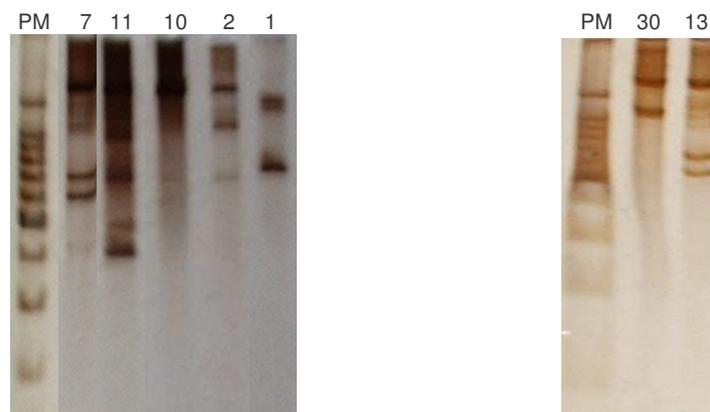


Figura 12 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 3*. PM = Peso Molecular (100bp).

O tamanho dos fragmentos com o *primer 4* variou de 325 a > 1500 bp, sendo que cada amostra apresentou de 1 a 10 bandas, com uma média de 5 bandas, nenhuma banda foi comum a todos os isolados (Figuras 13 e 14).

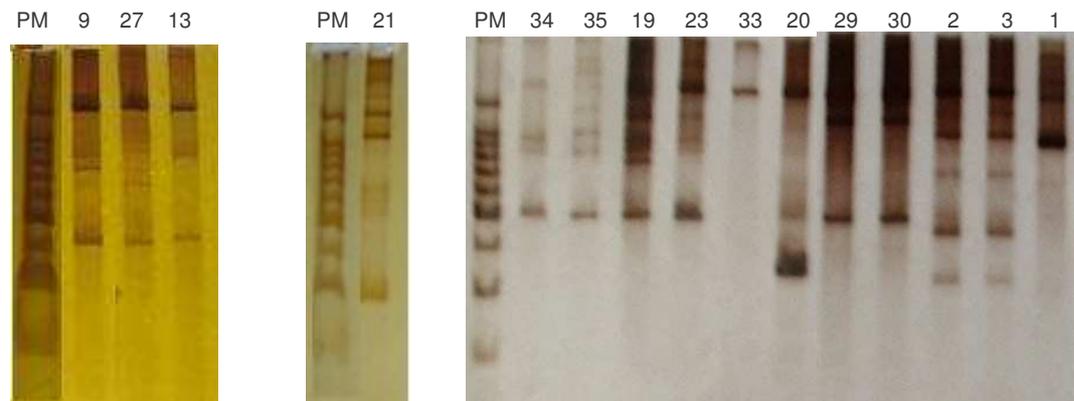


Figura 13 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 4*. PM = Peso Molecular (100bp).

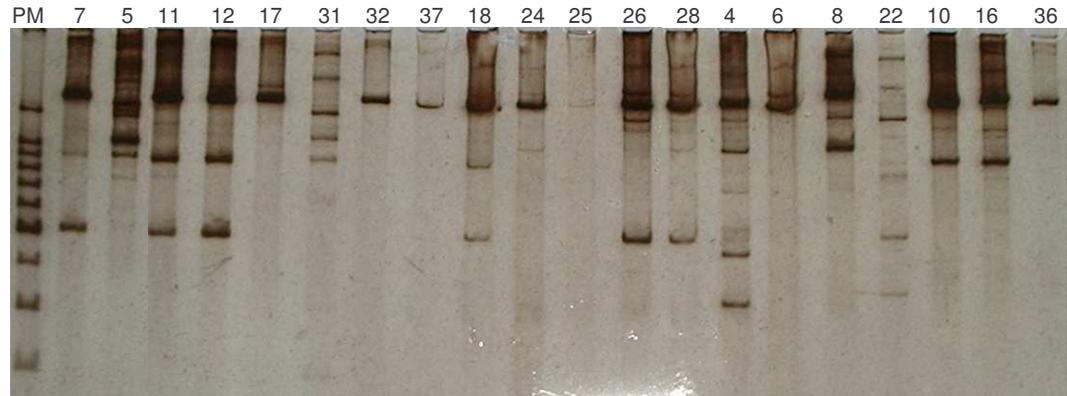


Figura 14 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 4*. PM = Peso Molecular (100bp).

O tamanho dos fragmentos dos produtos amplificados com o *primer 5* variou de 209 a > 1500 bp, sendo que as amostras apresentaram de 2 a 17 bandas, com uma média de 10 bandas, entretanto, nenhuma banda foi comum a todos os

isolados. Este *primer* produziu o maior número de bandas por amostra (Figuras 15 e 16).

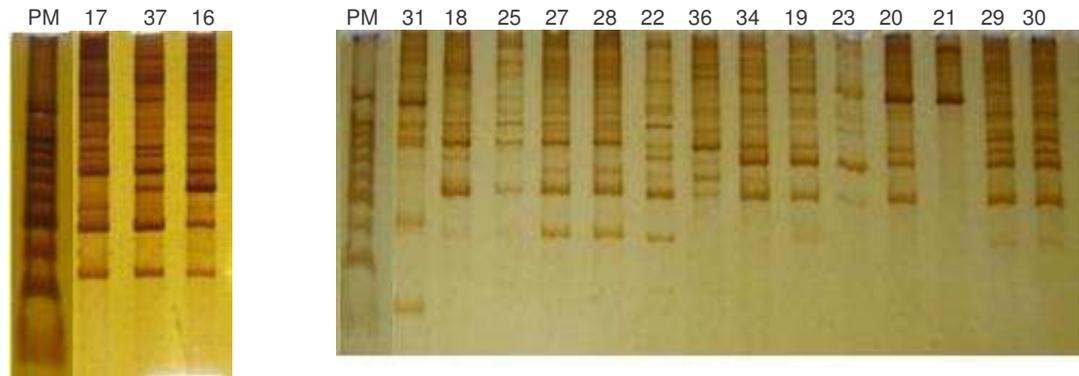


Figura 15 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer* 5. PM = Peso Molecular (100bp).

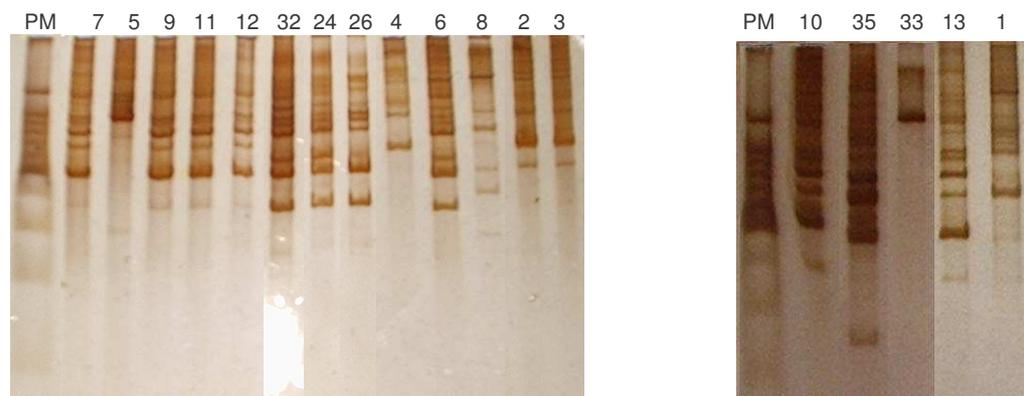


Figura 16 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer* 5. PM = Peso Moelcular (100bp).

O tamanho dos fragmentos dos produtos amplificados utilizando o *primer* 6 variou de 322 a > 1500 bp, sendo que cada amostra apresentou de 2 a 11 bandas, com uma média de 7 bandas, nenhuma banda foi comum a todos os isolados (Figura 17 e 18).

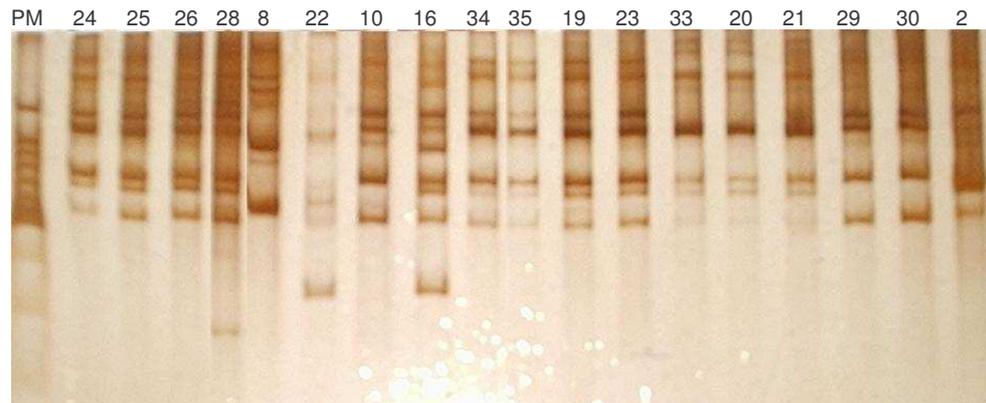


Figura 17 Gel de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 6*. PM = Peso Molecular (100bp).

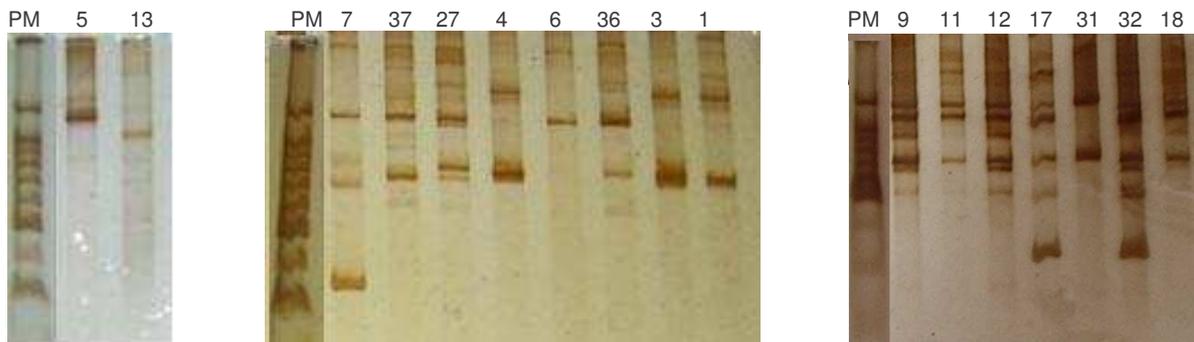


Figura 18 Géis de eletroforese dos produtos de RAPD utilizando o *primer 6*. PM = Peso Molecular (100bp).

O peso molecular das bandas presentes nos géis dos produtos amplificados que foram consideradas para análise estão relacionadas nos anexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

A diversidade e o relacionamento genético entre as amostras obtidos a partir da análise computacional pelo programa NTSYS-pc 1.7 das bandas presentes nos géis que foram consideradas para análise, podem ser melhor observadas nos dendogramas (Anexos 7, 8, 9, 10, 11 e 12), bem como o coeficiente de similaridade de Jaccard.

Os seis *primers* apresentaram diferente poder discriminatório produzindo diferente número de perfis. Nenhum *primer* sozinho conseguiu discriminar todos os isolados de *Salmonella spp.*, entretanto, ao combinar todos os seis *primers* foi possível discriminar as 35 amostras de *Salmonella spp.*, resultando em 35 padrões RAPD individuais e distintos, mostrando que as amostras são geneticamente diversas. Os isolados que apresentaram pelo menos 1 banda polimórfica foram considerados suficientemente divergentes.

Os *primers* 1 e 3 apresentaram 26 perfis diferentes; o *primer* 2, 32 perfis (produziu um maior número de perfis); o *primer* 4, 28 perfis; o *primer* 5, 31 perfis e o *primer* 6, 25 perfis (apresentando um menor poder discriminatório). Os perfis de RAPD das 35 amostras obtidos por cada *primer* estão relacionados na Tabela 4.

Tabela 4 Perfil RAPD das amostras de *Salmonella spp.* em relação a cada primer

Nº da Cepa	Sorotipo	Origem	Primer 1	Primer 2	Primer 3	Primer 4	Primer 5	Primer 6
7	<i>S. Enteritidis</i>	ATCC 13.076	A1	B1	C1	D1	E1	F1
5	<i>S. Enteritidis</i>	Fezes Humanas	A1	B2	C2	D2	E2	F2
9	<i>S. Enteritidis</i>	Fezes Humanas	A2	B3	C3	D3	E3	F3
11	<i>S. Enteritidis</i>	Fezes Humanas	A3	B4	C4	D4	E3	F4
12	<i>S. Enteritidis</i>	Fezes Humanas	A3	B3	C3	D1	E4	F3
17	<i>S. Enteritidis</i>	Fezes Humanas	A2	B5	C5	D5	E5	F5
31	<i>S. Enteritidis</i>	Fezes Humanas	A4	B6	C6	D6	E6	F6
32	<i>S. Enteritidis</i>	Fezes Humanas	A5	B7	C7	D7	E7	F7
37	<i>S. Enteritidis</i>	Sangue Humano	A6	B8	C8	D7	E8	F8
18	<i>S. Enteritidis</i>	Frango	A7	B9	C8	D1	E9	F3
24	<i>S. Agona</i>	Frango	A8	B10	C9	D8	E10	F9
25	<i>S. Agona</i>	Frango	A9	B11	C10	D9	E11	F9
26	<i>S. Agona</i>	Frango	A10	B11	C10	D10	E12	F9
27	<i>S. Agona</i>	Frango	A11	B12	C10	D11	E13	F10
28	<i>S. Agona</i>	Frango	A12	B13	C10	D12	E13	F11
4	<i>S. Agona</i>	Água ambiental	A13	B14	C11	D13	E14	F12
6	<i>S. Agona</i>	Água ambiental	A14	B15	C12	D14	E15	F13
8	<i>S. Agona</i>	Água ambiental	A15	B16	C13	D15	E16	F14
22	<i>S. Agona</i>	Água residual	A16	B17	C14	D16	E17	F15
10	<i>S. Typhimurium</i>	ATCC 13.311	A17	B18	C15	D17	E18	F16
16	<i>S. Typhimurium</i>	Sangue Humano	A18	B19	C16	D17	E19	F17
36	<i>S. Typhimurium</i>	Sangue Humano	A19	B20	C17	D18	E20	F18
34	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (8,20:64,Z23:-)	Sangue Humano	A6	B21	C18	D19	E21	F19
35	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (8,20:64,Z23:-)	Sangue Humano	A20	B22	C19	D20	E22	F19
19	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (8,20:64,Z23:-)	Frango	A7	B23	C20	D21	E23	F20
23	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (068:64,Z23:-)	Frango	A6	B22	C21	D22	E24	F19
33	<i>S. Panama</i>	Frango	A21	B24	C10	D7	E25	F21
20	<i>S. Panama</i>	Água residual	A21	B25	C18	D23	E26	F21
21	<i>S. Panama</i>	Água residual	A22	B26	C18	D24	E27	F21
29	<i>S. Schwarzengrund</i>	Frango	A23	B27	C22	D25	E28	F22
30	<i>S. Schwarzengrund</i>	Frango	A23	B28	C23	D25	E28	F22
2	<i>S. Houtenae</i>	Água ambiental	A24	B29	C24	D26	E29	F23
3	<i>S. Houtenae</i>	Água ambiental	A24	B30	C11	D26	E29	F12
13	<i>S. Newport</i>	Fezes Humanas	A25	B31	C25	D27	E30	F24
1	<i>S. Tennessee</i>	Ostra	A26	B32	C26	D28	E31	F25

A1-A26, B1-B32, C1-C26, D1-D28, E1-E31, F1-F25 representam os diferentes perfis de RAPD com relação a cada primer.

6 DISCUSSÃO

A *Salmonella spp.* pode sofrer constantes variações genéticas, as quais se devem a mutações, inserções e deleções adquirindo fatores de virulência e genes de resistência (YAN et al., 2003).

Nas últimas décadas, com o advento da Biologia Molecular, vários métodos têm sido desenvolvidos, o que permite detectar as variações genéticas presentes nos isolados e, portanto, a diferenciação de cepas da mesma espécie (LIN et al., 1996).

A discriminação dos isolados de *Salmonella spp.* auxilia no reconhecimento inicial, identificação de fontes do microrganismo e fatores de risco, o que permite traçar a cadeia de transmissão e difusão ambiental, necessário para implantação de medidas de controle mais eficientes (LACONHA et al., 1998).

A técnica de RAPD está sendo muito utilizada para tipagem por ser uma técnica eficiente, de baixo custo, rápida e reprodutível (RUIZ et al., 2003).

A otimização das condições de amplificação do RAPD foi realizada nos ensaios com diferentes quantidades de *primer* (5 μ L e 3 μ L) e temperaturas de anelamento (35°C e 40°C), visando melhor visualização dos produtos amplificados. Verificou-se que as reações submetidas a temperatura de anelamento de 35°C e com 3 μ L de *primer* apresentaram melhores resultados.

Foram utilizados diversos controles para avaliar algumas características importantes e desejáveis em um teste padrão para a detecção diferencial. A reação utilizando um sistema comercial totalmente padronizado (Ready-To-Go RAPD Analysis Beads) possibilitou uma rápida otimização para as amostras padrão de *Salmonella* Enteritidis e Typhimurium. Os DNAs controles de *E. coli* BL21 e C1a e ATCC 13.076 e ATCC 13.311 demonstraram reprodutibilidade e sensibilidade das reações.

Para garantir a reprodutibilidade do método 10% das amostras foram realizadas em duplicata e não houve perda no número ou mudança de posição das bandas. Nenhum produto de amplificação foi visto em reações realizadas na ausência de DNA-alvo (Figuras 3, 4, e 8).

Neste estudo, verificou-se que a técnica de RAPD é discriminatória e reprodutível para isolados de um mesmo sorotipo de *Salmonella spp.* dependendo do número de *primers* usados; o uso de seis primers é suficiente para obter um bom índice de discriminação entre os isolados. Isto sugere que o método é de grande valor para triagem e monitoramento da epidemiologia das infecções por *Salmonella spp.* nos programas de controle em humanos e animais.

A análise dos produtos de RAPD através do programa computacional NTSYS permitiu a construção de um dendograma, que facilitou a análise do relacionamento e divergência entre as amostras, o qual foi construído a partir de cada *primer* individualmente.

Ao utilizar o *primer* 1, as 35 amostras de *Salmonella spp.* apresentaram 26 perfis de RAPD distintos, enquanto que LIM et al., 2005, obteve 51 perfis distintos das 57 amostras utilizadas.

As dez amostras de *S. Enteritidis* (isolados 5, 7, 9, 11, 12, 17, 18, 31, 32 e 37) formaram sete grupos distintos, sendo que os isolados 5 e 7 formaram 1 grupo, ou seja, apresentaram o mesmo perfil, sendo, portanto, idênticas, uma amostra de *S. Enteritidis* igual a amostra padrão; os isolados 9 e 17, outro grupo, ambas as amostras foram provenientes de fezes humanas; os isolados 11 e 12, outro grupo, também provenientes de fezes humanas e os demais isolados (18, 31, 32 e 37) formaram grupos individuais. Semelhante ao observado por CHANSIRIPORNCHAI e cols. (2000) que de 8 amostras de *S. Enteritidis*, 5 mostraram perfis idênticos, enquanto 3, apresentaram perfis individuais. No entanto, LIM et al. (2005) obteve o mesmo perfil entre as 2 amostras de *S. Enteritidis* utilizadas.

Os isolados 18, 32 e 37 apresentaram pouca diversidade, sendo que o isolado 37 possuía uma banda fraca adicional de 850 bp; o isolado 18, além do fragmento de 850 bp possuía uma banda de forte intensidade de 729 bp.

As nove amostras de *S. Agona* (isolados 4, 6, 8, 22, 24, 25, 26, 27 e 28) foram todas distintas, sendo que os isolados 24, 25 e 26 apresentaram pouca diversidade no perfil; o isolado 24 possuía uma banda adicional de fraca intensidade de 600 bp; o 25, uma de 475 bp e, o 26, não possuía a banda de 800 bp.

Os isolados 4, 6, 8, 27 e 28 apresentaram 3 bandas comuns de 1208, 900 e 525 bp, sendo que o isolado 6 possuía uma banda adicional de fraca intensidade de 700 bp; o 4, possuía 2 bandas adicionais de fraca intensidade de 1500 e 750 bp e, o 2, possuía 2 bandas adicionais de fraca intensidade de 800 e 329 bp em relação ao isolado 27.

As amostras de *S. Typhimurium* (isolados 10, 16 e 36) foram distintas, sendo que os isolados 10 e 16 mostraram pouca diversidade, o isolado 10 (cepa padrão) possuía 2 bandas adicionais de 1403 e 950 bp e o isolado 16 possuía uma banda adicional de 525 bp. Diferente do encontrado por CHANSIRIPORNCHAI e cols. que das 3 amostras de *S. Typhimurium*, 2, apresentaram o mesmo perfil.

As amostras de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) (isolados 19, 34 e 35) foram distintas entre si, entretanto o isolado 34 foi idêntico ao isolado 37 (*S. Enteritidis*), ambos provenientes de hemocultura, assim como o isolado 19 foi idêntico ao isolado 18 (*S. Enteritidis*), ambos provenientes de frango. Perfis idênticos em sorotipos diferentes, porém provenientes da mesma fonte. De acordo com CHANSIRIPORNCHAI e cols. (2000) que obteve perfis idênticos de *S. Typhimurium* e *S. Saintpaul* provenientes de pato. Os isolados 19 e 34 diferenciaram pela presença de uma banda de forte intensidade de 729 bp no isolado 19. O isolado 35 apresentou um perfil único, sendo distinto dos demais.

A única amostra de *S. enterica* subsp. *enterica* (068:64,Z23: -) (isolado 23) apresentou o mesmo perfil do isolado 34 pertencente ao sorotipo *S. enterica*

subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) e do isolado 37 sorotipado como *S. Enteritidis*, porém proveniente de fontes distintas (sangue humano e frango).

As amostras de *S. Panama* (isolados 20, 21 e 33) constituíram 2 grupos distintos. Os isolados 20 e 33 foram idênticos apresentando o mesmo perfil embora proveniente de fontes diferentes (água e frango, respectivamente) e o isolado 21 foi distinto por apresentar 2 bandas adicionais de 1500 e 1350 bp.

As duas amostras de *S. Schwarzengrund* (isolados 29 e 30) foram idênticos, ambos provenientes de frango, assim como as duas amostras de *S. Houtenae* (isolados 2 e 3), ambos provenientes de água. Diferente do obtido por LIM e cols. (2005) em que as duas amostras de *S. Schwarzengrund* apresentaram perfis distintos.

Os isolados de *S. Newport* (isolado 13) e *S. Tennessee* (isolado 1) apresentaram perfis distintos.

Ao utilizar o *primer 2*, as 35 amostras de *Salmonella spp.* apresentaram 32 perfis distintos, semelhante ao obtido por CHANSIRIPORNCHAI e cols. (2000) em que das 30 amostras de *Salmonella spp.* obtiveram 28 perfis distintos.

As 10 amostras de *S. Enteritidis* (isolados 5, 7, 9, 11, 12, 17, 18, 31, 32 e 37) formaram nove grupos distintos. Somente os isolados 9 e 12 apresentaram o mesmo perfil, ambos provenientes de fezes humanas. O isolado 18 diferenciou destes dois isolados pela presença de uma banda de 1105 bp e o isolado 11, pela

presença de 2 bandas de fraca intensidade de 800 e 265 bp. Semelhante ao observado por CHANSIRIPORNCHAI e cols. (2000) que das 8 amostras de *S. Enteritidis*, 3 apresentaram o mesmo perfil.

Os isolados 17, 31 e 32 mostraram pouca diversidade no perfil, apresentaram 3 bandas comuns de 950, 700 e 440 bp, sendo que o isolado 31 apresentou uma banda adicional de fraca intensidade de 1150 bp, o isolado 32, duas bandas de fraca intensidade de 800 e 377 bp e o isolado 37, duas bandas de fraca intensidade de 377 e 323 bp. Enquanto que os demais isolados apresentaram diferentes padrões de bandas.

Os nove isolados de *S. Agona* (isolados 4, 6, 8, 22, 24, 25, 26, 27 e 28) formaram 8 grupos distintos, somente os isolados 25 e 26 foram idênticos, ambos provenientes de frango. O isolado 24 diferenciou destas duas cepas pela presença de duas bandas de fraca intensidade de 1100 e 377 bp.

As amostras 27 e 28 mostraram pouca diversidade no perfil, diferenciaram pela presença das bandas de 1000 e 300 bp do isolado 27 e pela presença da banda de fraca intensidade de 1386 bp no isolado 28. Os demais isolados apresentaram diferentes padrões de bandas.

Os três isolados de *S. Typhimurium* (isolados 10, 16 e 36) apresentaram perfis distintos, entretanto, possuíam duas bandas comuns de 850 e 456 bp, também observadas por MHAND e cols. (1999). As amostras 10 e 36 mostraram pouca diversidade no perfil, diferenciando-se pela presença de uma banda de 1000

bp no isolado 10 (cepa padrão) e uma banda de fraca intensidade de 500 bp no isolado 36 e o isolado 16 possuía duas bandas adicionais aos isolados 10 e 36 de 1500 e 345 bp. Semelhante ao observado por CHANSIRIPORNCHAI e cols. (2000) em que as 3 amostras de *S. Typhimurium* apresentaram perfis distintos.

Os três isolados de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) (isolados 19, 34 e 35) foram distintos, sendo que os isolados 35 e 19 apresentaram quatro bandas comuns de 1500, 800, 600 e 500 bp. Enquanto que a única cepa de *S. enterica* subsp. *enterica* (068:64,Z23: -) (isolado 23) apresentou o mesmo perfil do isolado 35, portanto, mesmo perfil em isolados de diferentes sorotipos e fontes distintas (sangue e frango). Diferente do encontrado por CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) em que apresentou o mesmo perfil somente às amostras de *S. Enteritidis* provenientes da mesma fonte.

As amostras de *S. Panama* (isolados 20, 21 e 33), *S. Schwarzengrund* (isolados 29 e 30), *S. Houtenae* (isolados 2 e 3), *S. Newport* (isolado 13) e *S. Tennessee* (isolado 1) apresentaram perfis distintos, sendo que os isolados 33 e 21 apresentaram 3 bandas comuns de 1500, 700 e 456 bp, os isolados 29 e 30, uma banda comum de 1500 bp e o isolado 20 não apresentou nenhum perfil de bandas utilizando este *primer*.

Ao utilizar o *primer* 3, as 35 amostras de *Salmonella* spp. apresentaram 26 perfis RAPD distintos, semelhante ao obtido por CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) em que as 30 amostras de *Salmonella* spp. apresentaram 25 perfis distintos.

As 10 amostras de *S. Enteritidis* (isolados 5, 7, 9, 11, 12, 17, 18, 31, 32 e 37) formaram 8 grupos distintos. Os isolados 9 e 12 foram idênticos, ambos provenientes de fezes humanas e os isolados 18 e 37 também, embora provenientes de fontes distintas (frango e sangue). Os demais isolados apresentaram diferentes padrões de bandas. CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) obtiveram 7 perfis distintos das 8 amostras de *S. Enteritidis*, todas provenientes da mesma fonte.

Os nove isolados de *S. Agona* (isolados 4, 6, 8, 22, 24, 25, 26, 27, 28) formaram 6 grupos distintos. Os isolados 25, 26, 27 e 28 foram idênticos, sendo todos provenientes de frango. Os isolados 24 e 6 apresentaram perfis distintos pela presença de diferentes bandas > 1500 bp e os demais isolados apresentaram diferentes padrões de bandas.

Os três isolados de *S. Typhimurium* (isolados 10, 16 e 36), os 3, de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) (isolados 19, 34 e 35) e o isolado 23 de *S. enterica* subsp. *enterica* (068:64,Z23: -) foram distintos, sendo que os isolados 16 e 36 mostraram pouca diversidade no perfil, pois o isolado 16 apresentou uma banda adicional de 940 bp. CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) também discriminou as 3 amostras de *S. Typhimurium*, utilizando este *primer*.

Os três isolados de *S. Panama* (isolados 20, 21 e 33) formaram dois grupos distintos. Os isolados 20 e 21 apresentaram o mesmo perfil, sendo idênticos também ao isolado 34 de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -), mesmo perfil em diferentes sorotipos provenientes de fontes distintas (água e sangue). Enquanto que o isolado 33 foi idêntico aos isolados 25, 26, 27 e 28 de *S. Agona*, ambos

provenientes de frango, mesmo perfil em diferentes sorotipos provenientes da mesma fonte.

As duas amostras de *S. Schwarzengrund* (isolados 29 e 30), as duas de *S. Houtenae* (isolados 2 e 3), o isolado 13 de *S. Newport* e o isolado 1 de *S. Tennessee* apresentaram perfis distintos. Entretanto, o isolado 3 de *S. Houtenae* foi idêntico ao isolado 4 de *S. Agona*, ambos provenientes de água.

Ao utilizar o primer 4, as 35 amostras de *Salmonella spp.* apresentaram 28 perfis distintos, enquanto que CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) obtiveram 20 perfis das 30 amostras utilizadas.

Os dez isolados de *S. Enteritidis* (isolados 5, 7, 9, 11, 12, 17, 18, 31, 32 e 37) formaram 7 grupos distintos. Os isolados 12 e 18 foram idênticos a cepa padrão (isolado 7), mesmo perfil em fontes distintas (fezes e frango), assim como os isolados 32 e 37, perfis idênticos em fontes distintas (fezes e sangue) e o isolado 11, diferenciou por possuir uma banda adicional de 500 bp. Enquanto que os isolados 5, 9 e 31 apresentaram apenas uma banda comum de 1500 bp. Entretanto, em CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000), as 8 amostras de *S. Enteritidis* apresentaram padrões idênticos, sendo este distinto de todas as outras cepas testadas.

Todos os isolados de *S. Agona* (isolados 4, 6, 8, 22, 24, 25, 26, 27 e 28) apresentaram perfis distintos. Apenas os isolados 8 e 22 não apresentaram a banda comum de 1500 bp. Os isolados 6 e 25 diferenciaram pela presença de duas bandas adicionais > 1500 bp no isolado 6. Os isolados 26 e 28 possuíam 3 bandas comuns

de 1500, 1125 e 460 bp, sendo que o isolado 26 possuía uma banda adicional de 1375 bp e o isolado 28 uma banda adicional de fraca intensidade de 900 bp.

Os três isolados de *S. Typhimurium* (isolados 10, 16 e 36) formaram dois grupos distintos. A amostra 16, isolado de sangue humano, foi idêntico ao isolado 10 (cepa padrão) e o isolado 36 diferenciou por não possuir as bandas de 1000 e 800bp. Enquanto que em CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000), as 3 amostras de *S. Typhimurium* apresentaram padrões distintos.

Os três isolados de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) (isolados 19, 34 e 35) formaram grupos distintos e possuíam 2 bandas comuns de 850 e 500 bp. O isolado 34 possuía uma banda adicional de fraca intensidade de 900 bp. Os isolados 19 e 35 mostraram pouca diversidade no perfil, diferenciaram pela presença de uma banda adicional de fraca intensidade de 1000 bp presente no isolado 35 e pelas bandas de 900 e 700 bp presente no isolado 19.

A cepa de *S. enterica* subsp. *enterica* (068:64,Z23: -) (isolados 23) diferenciou do isolado 35 de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) pela ausência de uma banda > 1500 bp.

Os três isolados de *S. Panama* (isolados 20, 21 e 33) formaram grupos distintos. A amostra 33, proveniente de frango, foi idêntica aos isolados 32 e 37 de *S. Enteritidis*, provenientes de fezes e sangue humano, respectivamente. Os isolados 20 e 21 apresentaram diferentes padrões de bandas.

Os isolados de *S. Schwarzengrund* (isolados 29 e 30) apresentaram perfis idênticos, ambos provenientes de frango, assim como os isolados de *S. Houtenae* (isolados 2 e 3), ambos provenientes de água. Enquanto que os isolados de *S. Newport* e *S. Tennessee* apresentaram perfis distintos.

Ao utilizar o *primer 5*, as 35 amostras de *Salmonella spp.* apresentaram 31 perfis distintos, enquanto que CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000), obtiveram 20 perfis distintos das 30 amostras de *Salmonella spp.* utilizadas e QUINTAES et al. (2002) obtiveram 6 perfis das 30 amostras de *Salmonella Typhi* utilizadas.

Os dez isolados de *S. Enteritidis* (isolados 5, 7, 9, 11, 12, 17, 18, 31, 32 e 37) formaram nove grupos distintos. Os isolados 9 e 11 foram idênticos, ambos provenientes de fezes humanas, diferenciaram da cepa padrão (isolado 7) pela ausência de uma banda de 1250 bp, o isolado 12, diferenciou da cepa padrão pela ausência de uma banda > 1500 bp, o isolado 37 diferenciou do isolado 12 por possuir duas bandas adicionais de 1365 e 680 bp e ausência da banda de 550 bp. Os demais isolados apresentaram perfis distintos. CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) obtiveram apenas 3 perfis dos 8 isolados de *S. Enteritidis*.

Os nove isolados de *S. Agona* (isolados 4, 6, 8, 22, 24, 25, 26, 27 e 28) formaram oito grupos distintos. Os isolados 27 e 28 apresentaram perfis idênticos, ambos foram provenientes de frango, o isolado 25 diferenciou por possuir uma banda adicional de 860 bp e a ausência da banda de 643 bp. Os isolados 24 e 26 diferenciaram pela presença de uma banda adicional de fraca intensidade de 1500 bp no isolado 24. Os demais isolados apresentaram perfis distintos.

Os isolados de *S. Panama* (isolados 20, 21 e 33) e *S. Typhimurium* (isolados 10, 16 e 36) foram distintos, sendo que estes três isolados possuíam duas bandas comuns de 900 e 500 bp. CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) também discriminou as 3 amostras de *S. Typhimurium*.

Os três isolados de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) (isolados 19, 34 e 35) apresentaram perfis distintos. Os isolados 19 e 34 mostraram pouca diversidade no perfil, diferenciaram pela presença de uma banda adicional de fraca intensidade de 600 bp no isolado 34 e uma banda adicional de fraca intensidade de 373 bp no isolado 19. Enquanto que o isolado 35 apresentou um perfil distinto.

A cepa de *S. enterica* subsp. *enterica* (068:64,Z23: -) (isolado 23) diferenciou do isolado 19 de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) pela ausência da banda de 373 bp.

Os isolados de *S. Schwarzengrund* (isolados 29 e 30) apresentaram perfis idênticos, ambos provenientes de frango, assim como os isolados de *S. Houtenae* (isolados 2 e 3), ambos provenientes de água. Enquanto que o isolado 13 de *S. Newport* e o isolado 1 de *S. Tennessee* apresentaram perfis distintos, apesar de possuírem 6 bandas comuns de 1500, 1333, 1000, 667, 477 e 356 bp.

Ao utilizar o primer 6, as 35 amostras de *Salmonella spp.* apresentaram 25 perfis distintos, enquanto que CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) obtiveram 19 perfis das 30 amostras utilizadas.

Os dez isolados de *S. Enteritidis* (isolados 5, 7, 9, 11, 12, 17, 18, 31, 32 e 37) formaram oito grupos distintos. Os isolados 9, 12 e 18 foram idênticos embora provenientes de fontes diferentes (fezes humana e frango), o isolado 17 diferenciou pela ausência de uma banda de 975 bp e pela presença da banda de 322 bp e o isolado 32, pela presença de duas bandas adicionais de 550 e 322 bp. CHANSIRIPORNCHAI et al. (2000) obtiveram somente 2 perfis dos 8 isolados de *S. Enteritidis* sendo todos provenientes da mesma fonte.

Os nove isolados de *S. Agona* (isolados 4, 6, 8, 22, 24, 25, 26, 27 e 28) formaram sete grupos distintos. Os isolados 24, 25 e 26 apresentaram perfis idênticos, ambos provenientes de frango, enquanto que as demais amostras apresentaram perfis distintos. CHANSIRIPORNCHAI e cols. (2000) obtiveram o mesmo perfil entre *S. Agona* e *S. anatum* ambos provenientes de frango.

Os três isolados de *S. Typhimurium* (isolados 10, 16 e 36), o isolado 13 de *S. Newport* e o isolado 1 de *S. Tennessee* apresentaram perfis distintos. Diferente do obtido por CHANSIRIPORNCHAI e cols. (2000) que os 3 isolados de *S. Typhimurium* apresentaram 2 perfis distintos.

Os três isolados de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23: -) (isolados 19, 34 e 35) formaram dois grupos distintos. Os isolados 34 e 35 apresentaram perfis idênticos, ambos provenientes de hemocultura, sendo idêntica também ao isolado 23 de *S. enterica* subsp. *enterica* (068:64,Z23: -), proveniente de frango. O isolado 19 diferenciou por possuir uma banda adicional de fraca intensidade de 550 bp.

Os três isolados de *S. Panama* (isolados 20, 21 e 33), provenientes de frango e água, respectivamente, apresentaram perfis idênticos, assim como os isolados 29 e 30 de *S. Schwarzengrund*, ambos provenientes de frango.

Os isolados de *S. Houtenae* (isolados 2 e 3) apresentaram perfis distintos, sendo que o isolado 3 apresentou perfil idêntico ao isolado 4 de *S. Agona*, ambos provenientes de água.

As duas cepas de *S. Schwarzengrund* foram idênticas com os *primers* 1, 4, 5 e 6, porém distintas com os *primers* 2 e 3, e as duas de *S. Houtenae* foram idênticas com os *primers* 1, 4 e 5, porém distintas com os *primers* 2, 3 e 6, e as três cepas de *S. Panama* apresentaram perfis idênticos com o *primer* 6, mas apresentaram perfis distintos com os demais *primers*, da mesma forma que as 2 amostras de *S. enterica* subsp. *enterica* (8,20:64,Z23:-) isoladas de sangue. Portanto, os *primers* 1, 4 e 5 são mais específicos inter-sorovar e os *primers* 2 e 3, intra-sorovar.

Das 10 amostras de *S. Enteritidis* foram obtidos 7 perfis diferentes de RAPD com *primers* 1 e 4; 8 com *primers* 3 e 6, e, 9 com os *primers* 2 e 5, sendo esses, portanto os 2 melhores *primers* para discriminar o sorotipo *Enteritidis*.

As análises do DNA total por RAPD, utilizando os iniciadores 2 e 5 foram capazes de discriminar as 35 amostras de *Salmonella spp.* deste estudo.

A análise dos produtos amplificados revelou grande homologia entre as amostras principalmente quando se utilizou os iniciadores 1, 3, 4 e 6.

Observou-se que amostras pertencentes a sorotipos e fontes distintas (sangue e frango; fezes e frango e água e frango) apresentaram o mesmo perfil e amostras do mesmo sorotipo foram geneticamente diversas.

Ao agrupar as amostras de *Salmonella spp.* pode-se observar um possível relacionamento epidemiológico entre as amostras, provavelmente a infecção patogênica nos seres humanos ocorre através da ingestão de frango contaminado, pois seis amostras humanas apresentaram o mesmo perfil de amostras provenientes de frango.

Com o primer 1, as amostras 37 e 34, ambas provenientes de sangue humano, apresentaram o mesmo perfil da amostra 23, isolada de frango. Com o primer 2, a amostra 35 apresentou o mesmo perfil da amostra 23, isoladas de sangue e frango, respectivamente. Com o primer 3, as amostras 37 (isolada de sangue) apresentou o mesmo perfil da amostra 18 (isolada de frango). Com o primer 4, as amostras 32 e 37 foi idêntica a 33, isoladas de fezes, sangue e frango, respectivamente, e a amostra 12, isolada de fezes, idêntica a 18, isolada de frango. Com o primer 6, os isolados 34 e 35, isoladas de sangue humano, apresentou o mesmo perfil do isolado 23, proveniente de frango, e as amostras 9 e 12 isoladas de fezes semelhante a 18, isolada de frango.

7 CONCLUSÃO

Com o presente estudo foi possível discriminar as 35 amostras de *Salmonella spp.* isoladas de diversas fontes da cidade de Aracaju-SE, bem como verificar o relacionamento epidemiológico entre os diferentes isolados.

Concluiu-se que o RAPD, utilizando-se no mínimo três primers, é uma boa técnica para tipagem molecular por ser simples e rápida, confirmando em um período de tempo muito curto se um grupo de isolados de *Salmonella spp.* está ou não relacionado, assim, permitindo a execução de medidas de saúde pública necessárias para controlar a infecção.

A discriminação das 35 amostras de *Salmonella spp.* mostrou que existe uma ampla biodiversidade genética entre as amostras circulantes na cidade de Aracaju-SE. Tal biodiversidade representa uma grande possibilidade de novas combinações genéticas com incrementos de fatores de virulência e genes de resistência presente nas diversas cepas.

Não há uma rota específica de transmissão da *Salmonella spp.* na cidade de Aracaju-SE, existe várias fontes de contaminação precisando de medidas urgentes de controle sanitário.

Ao agrupar as amostras de *Salmonella spp.* evidenciou-se que provavelmente a contaminação humana ocorre através do frango, pois algumas amostras humanas, 3 de fezes e 3 de sangue, possuem grande homologia com as amostras de frango.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, D. R. e ANDRADE JÚNIOR, D. R. Typhoid fever as cellular microbiological model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. São Paulo, Vol. 45, n. 4, July/Aug, 2003.

ARVANITIDOU, M.; KANELLOU, K.; VAGIONA, D.G. Diversity of *Salmonella spp.* And fungi in northern Greek rivers and their correlation to fecal pollution indicators. **Environmental Research**. Vol. 99, n. 2, p. 278-284, October, 2005.

BÄUMLER, A. J. et al. Evolution of Host Adaptation in *Salmonella enterica*. **Infection and Immunity**. Vol. 66, n. 10, p. 4579-4587, October, 1998.

BIENDO, M. et al. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant clinical isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **International Journal of Medical Microbiology**. Vol. 293, p. 219-223, 2003.

BLACK, R. E. Epidemiology of diarrhoeal disease implications for control by vaccines. **Vaccine**. Vol. 11, p. 100-106, 1993.

BOISE, L. H. e COLLINS, C. M. *Salmonella*-induced cell death: apoptosis, necrosis or programmed cell death?. **TRENDS in Microbiology**. Vol. 9, n. 2, p. 64-67, February, 2001.

BRASIL, Leis, Decreto, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – RDC n. 12, **Diário Oficial**, Brasília, DF, 12 de janeiro de 2001.

BRUMELL, J. H. et al. Microbial Pathogenesis: New Niches for *Salmonella*. **Current Biology**. Vol. 12, p. 15-17, January, 2002.

CAMARGO, N. J. et al. Avaliação epidemiológica de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Estado do Paraná entre 1978 e 1997. In: Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, 11, 1998, Águas de Lindóia. **Anais: Águas de Lindóia – SP**, 1998, p. 67.

CARMO, L. S. et al. *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enteritidis* present in food implicated in food poisoning. **Revista de Microbiologia**. Vol 21, p. 320-323, 1990.

CARRAMIÑANA, J. J. et al. Potencial virulence determinants of *Salmonella* serovars from poultry and human sources in Spain. **Veterinary Microbiology**. Vol. 54, p. 375-383, 1997.

CHANSIRIPORNCHAI, N. et al. Application of randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. Vol. 29, p. 221-225, 2000.

CHIU, C. H.; LIN, T. Y. e OU, J. T. Age-Related differences of nontyphoid *Salmonella* bacteremia in clinical presentation and outcome: association with specific serovars but not necessarily with the virulence plasmids. **Clinical Infectious Diseases**. Vol. 30, p. 239-240, 2000.

DE CESARE, A. et al. Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* strain isolated in Italy. **Journal Applied Microbiology**. Vol. 91, n. 5, p. 780-785, November, 2001.

DEL CERRO, A. et al. PCR-based procedures in detection and DNA-fingerprinting of *Salmonella* from samples of animal origin. **Food Microbiology**. Vol. 19, p. 567-575, 2002.

EDWARDS, R. A.; OLSEN, G. J. e MALOY, S. R. Comparative genomics of closely related salmonellae. **TRENDS in Microbiology**. Vol. 10, n. 2, p. 94-99, February, 2002.

ERIKSSON, J. et al. Comparison of genotyping methods by application to *Salmonella* livingstone strains associated with an outbreak of human salmonellosis. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 104, n. 1, p. 93-103, 2005.

ERLICH, H. A; GELFAND, D, SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. **Science**. Vol. 252, n. 5013, p. 1643-1651, June, 1991.

ERNST, R. K.; GUINA, T.; MILLER, S. I. *Salmonella typhimurium* outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. **Microbes and Infection**. Vol. 3, p. 1327-1334, 2001.

EVEREST, P. et al. The molecular mechanisms of severe typhoid fever. **TRENDS in Microbiology**. Vol. 9, n. 7, p. 316-320, July, 2001.

FRANCO, G. M. B.; LANDGRAF, M. Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos. In: **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu. 1996. p. 33-81.

GAST, R. K. Paratyphoid Infections. In: CALNEK, B. W. et al. **Diseases of Poultry**. 10 ed. Ames: State University Press, 1997. p.97-121.

GROISMAN, E.A. e OCHMAN, H. How *Salmonella* became a pathogen. **TRENDS in Microbiology**. Vol 5, n. 9, p. 343-349, September, 1997.

HENSEL M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**. Vol. 294, p. 95-102, 2004.

HILTON, A. C.; BANKS, J. G.; PENN, C. W. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain differentiation and characterization of amplified sequences. **Journal of Applied Bacteriology**. Vol. 81, p. 575-584, 1996.

HOFER, E. et al. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Vol. 17, n. 2, 1997.

HUANG, D. B. e DUPANT, H. L. Problem pathogens: extra-intestinal complications of *Salmonella enterica* serotype Typhi infection. **Lancet Infection Disease**. Vol. 5, p. 341-48, June, 2005.

ISHIBASHI, Y. e ARAI, T. A possible mechanism for host-specific pathogenesis of *Salmonella* serovars. **Microbial Pathogenesis**. Vol. 21, p. 435-446, 1996.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 4 ed. New York: 1992.

JOKLIK, W. K. et al. **Microbiologia**. 20 ed. São Paulo: Panamericana, 1995.

KAUFMANN, S. H. E.; RAUPACH, B.; FINLAY, B. B. Introduction: microbiology and immunology: lessons learned from *Salmonella*. **Microbes and Infection**. Vol. 3, p. 1177-1181, 2001.

KHOODOO, M. H. R.; ISSACK, M. I.; JAUFEEERALLY- FAKIM, Y. Serotyping and RAPD profiles of *Salmonella enterica* isolates from Mauritius. **Letters in Applied Microbiology**. Vol. 35, n. 2, p. 146, August, 2002.

LACONCHA, I. et al. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 40, p. 27-34, 1998.

LANDERAS, E.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; MENDONZA, M. C. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis. Relationships between food, water and pathogenic strains. **Internacional Journal of Food Microbiology**. Vol. 43, p. 81-90, 1998.

LIM, H. et al. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 105, p. 411-418, 2005.

LIN, A. W. et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 34, n. 4, p. 870-876, April, 1996.

LINDQUIST, J. **Laboratory Manual for the food microbiology laboratory**. 1998 edition. [S.l.: s.n.].

LINEHAN, S. A. e HOLDEN, D. W. The interplay between *Salmonella typhimurium* and its macrophage host – what can it teach us about innate immunity?. **Immunology Letters**. Vol. 85, p. 183-192, 2003.

MAGUIRE, H. et al. Hospital outbreak of *Salmonella virchow* possibly associated with a food handler. **Journal of Hospital Infection**. Vol. 44, p. 261-266, 2000.

MARCUS, S. L. et al. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes and Infection**. Vol. 2, p. 145-156, 2000.

MARTINS, M. B. C. V. et al. Evolução dos surtos de toxinfecção alimentar no Estado de Minas Gerais, no período de agosto de 1991 a agosto de 1998. In: V Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos, 11, 1998, Águas de Lindóia. **Anais: Águas de Lindóia – SP**, 1998, p. 71.

MASTROENI, P. e SHEPPARD, M. *Salmonella* infections in the mouse model: host resistance factors and in vivo dynamics of bacterial spread and distribution in the tissues. **Microbes and Infection**. Vol. 6, p. 398-405, 2004.

_____ et al. *Salmonella*: Immune Responses and Vaccines. **The Veterinary Journal**. Vol. 161, p. 132-264, 2000.

MHAND, R. A. et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase producing *Salmonella typhimurium* phenotypic and genotypic typing methods. **Journal of Clinical Microbiology**. Vol. 37, n. 11, p. 3769-3773, November, 1999.

MYAMOTO, T. et al. Application of random amplified polymorphic DNA analysis for detection of *Salmonella spp.* in foods. **Journal Food Protection**. Vol. 61, n. 7, p. 785-791, July, 1998.

MUÑOZ, S. P. et al. Bacteremia en el curso de gastroenteritis a *Salmonella*. **Anales Españoles de Pediatría**. Vol. 46, n. 2, p. 151-155, 1997.

PASETTI, M. F.; LEVINE, M. M.; SZTEIN, M. B. Animal models paving the way for clinical trials of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi live oral vaccines and live vectors. **Vaccine**. Vol. 21, p. 401-418, 2003.

PERESI, J. T. et al. Surtos de enfermedades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**. Vol. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMUHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (nº 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**. Vol. 155, p. 568-570, 2004.

PORTILLO, F. G. *Salmonella* intracelular proliferation: where, when and how?. **Microbes and Infection**. Vol. 3, p. 1305-1311, 2001.

QUINTAES, B. R. et al. Conventional and molecular typing of *Salmonella* Typhi strains from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. Vol. 44, n. 6, 2002.

RAUPACH, B. e KAUFMANN, S. H. E. Bacterial virulence, proinflammatory cytokines and host immunity: how to choose the appropriate *Salmonella* vaccine strain?. **Microbes and Infection**. Vol. 3, p. 1261-1269, 2001.

REIJ, M. W. e AANTREKKER, E. D. D. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. **International Journal of Food Microbiology**. Vol. 91, p. 1-11, 2004.

ROHLF, F. J. **NTSYS-PC version 1.7 numerical taxonomy and multivariate analysis system**. New York: Exeter Software Publ, Setauket, N.Y., 1992.

ROSANOVA, M. T. et al. Risk factors for mortality caused by nontyphoidal *Salmonella sp.* in children. **International Journal of Infectious Disease**. Vol. 6, p. 187-190, 2002.

RUIZ, M. et al. Usefulness of diefferent techniques in the study of the epidemiology of salmonellosis. **APMIS**. Vol. 111, n. 9, p. 848-856, 2003.

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

SANTOS, R. L. e BÄUMLER, A. J. Cell tropismo of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**. Vol. 294, p. 225-233, 2004.

_____ et al. Pathogenesis of Salmonella-induced enteritis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. Vol. 36, n. 1, p. 3-12, January, 2003.

_____. Animal models of *Salmonella* infections: enteritis versus typhoid fever. **Microbes and Infections**. Vol. 3, p. 1335-1344, 2001.

SHANGKUAN, Y. H. e LIN, H. C. Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella typhi* and other *Salmonella* species. **Journal Applied of Microbiology**. Vol. 85, n. 4, p. 693-702, October, 1998.

SILVA, J. A. et al. Fenotipos bioquímicos y fagotipos de cepas de *Salmonella enteritidis* aisladas en Antofagasta, 1997-2000. **Revista Médica do Chile**. Santiago. Vol. 131, n. 8, p. 837-845, August, 2003.

SOTO, S. M. et al. Randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. **Applied Enviroment Microbiology**. Vol. 65, n. 11, p. 4830-4836, November, 1999.

TSUJI, H. e HAMADA, K. Outbreak of *Salmonella Chester* and *Salmonella Oranienburg*. **International Journal Infection Disease**. n. 52, p. 138-139, 1999.

UMASANKAR, S. et al. An outbreak of *Salmonella enteritidis* in a maternity and neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**. Vol. 34, p. 117-122, 1996.

VERONESI, R. e FOCACCIA, R. **Salmoneloses**. In: Tratado de Infectiologia, cap. 70, editora Atheneu. São Paulo, 1999.

WAIN, J. et al. Unlocking the genome of the human typhoid bacillus. **The Lancet Infectious Diseases**. Vol. 2, p. 163-170, March, 2002.

WALLIS, T. S. e GALYOV, E. E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**. Vol. 36, n. 5, p. 997-1005, June, 2000.

WELSH, J. e MCCLELLAND, M. Fingerprint genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acids Research**. Vol. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**. Vol. 18, n. 22, p. 6531-6532, 1990.

YAN, S. S. et al. An overview of *Salmonella* typing Public health perspectives. **Clinical and Applied Immunology Reviews**. Vol. 4, p. 189-204, 2003.

ANEXOS

Anexo 2 Peso molecular das bandas presentes nos géis consideradas para análise dos produtos de RAPD utilizando o *primer 2*

N° das Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	21	22	23	24	25	
N° de bandas >1500bp	4	2	2		3	1	2		3	4	3	3	2	5	1	3	2	2		3	2	1	
Peso Molecular (bp)	1500	900	1500	950	1500	900	900	500	1000	1000	1000	1000	1500	1500	950	1105	1500	1500	933	1500	1350	1350	
	1450	740	1357	700	1250	800	500		850	850	850	850	950	1000	700	1000	800	1000	900	1000	1100	950	
	1357	700	950	440	1000	382	440		700	700	800	700	800	850	440	850	600	850	438	850	950	800	
	1214	600	543	377	900	360			456	456	700	456	700	500	377	700	500	800		800	800	700	
	1000	400	400	323	700						456		456	456	323	456	360	700		700	700	440	
	950		300		500						265				345				456		660	440	377
	850				444																600	377	
	800																					571	
	760																					500	
	571																					480	
400																					456		

N° das Amostras	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
N° de bandas >1500bp	1	5	4	3	5	3	1	6	4	3	2	1
Peso Molecular (bp)	1350	1500	1500	1500	1500	1150	950	1500	850	1500	850	980
	950	1214	1386	1125	1000	950	800	1357	700	1000	700	933
	800	1000	1214	900	960	700	700	900	660	850	500	900
	700	850	850	740	850	440	440	700	456	800	456	450
	440	700	700	600	800		377	456	288	700		
	377	456	456	445	700				183	660		
		300			571				140	600		
					500					571		
					456					500		
					300					480		
									456			

Anexo 3 Peso molecular das bandas presentes nos géis consideradas para análise dos produtos de RAPD utilizando o *primer 3*

N° das Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24
N° de bandas >1500bp	2	2	5	5	4	3	2	3	2	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	3	1	2
Peso Molecular (bp)	880	1500	1300	1300	740	1400	1500	900	1400	1500	1500	1400	1375	940	1375	1376	1375			1375	1375	1400
		880	750	750	633	1300	1400	750	1300	1400	1400	1300	1000	600	1000	600	1000			850	600	1300
						750	800		933	880	880	933	900		600	500	750			600		750
							667		750		800	750	625				600					
							455		600		575	600	529									
										455												

N° das Amostras	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
N° de bandas >1500bp	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	3	2	2
Peso Molecular (bp)	1375	1375	1375	1375	1000	1125	1500	1000	1375		1300	600	1376
	1000	1000	1000	1000			900		1000		900		600
	600	600	600	600			660		600		750		500
							600						
						300							

Anexo 5 Peso molecular das bandas presentes nos géis consideradas para análise dos produtos de RAPD utilizando o *primer 5*

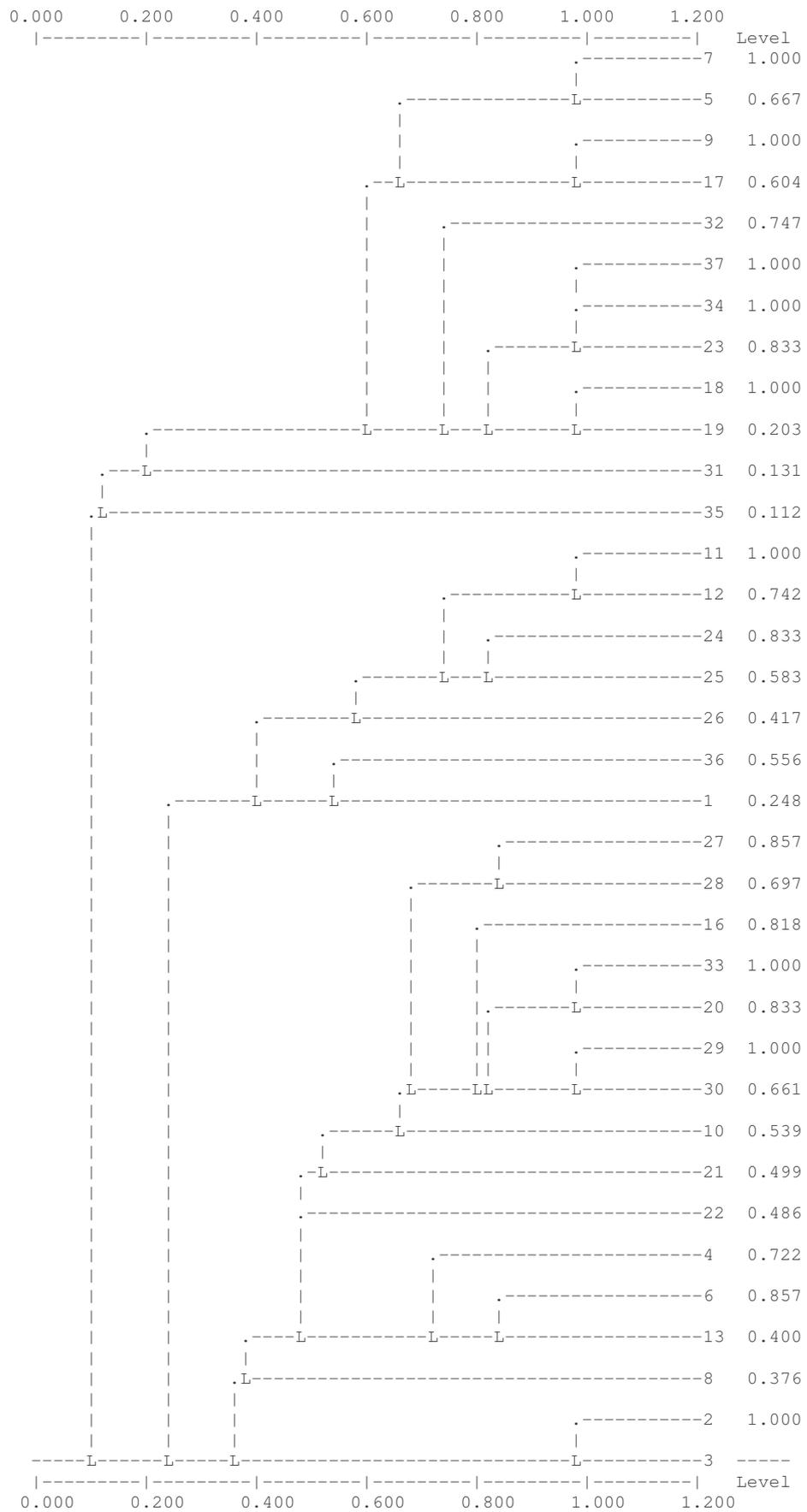
N° das Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	20	21	22	23	
N° de bandas >1500bp	4	5	5	5	2	4	4	3	4	2	4	3	4	6	4	2	3	1	1	3	2	
Peso Molecular (bp)	1500	1375	1375	1313	1500	1500	1500	1500	1500	1409	1500	1500	1500	1500	1500	960	1500	1275	1275	1100	1500	
	1333	900	900	800	1250	1250	1250	1000	950	1182	950	1250	1417	1365	1180	860	1100	1100		960	1100	
	1000	850	850		950	1125	950	800	925	1000	925	950	1333	1200	1000	700	900	800		800	900	
	750	600	600		800	950	925	583	800	900	800	925	1000	1000	900	500	800	675		700	800	
	667				300	700	800	440	700	800	700	800	950	900	790	373	675	500		643	675	
	477					550	700	300	500	700	500	700	800	790	550		500			500	500	
	356					375	500		363	578	363	500	667	680	500		373			373		
								363			500		363	477	550	355					241	
											378			356	500							
															430							
														355								

N° das Amostras	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
N° de bandas >1500bp	3	3	3	4	4	3	3	3	3	1	3	4	2	3
Peso Molecular (bp)	1500	1350	1375	1350	1350	1500	1500	1200	1500	1500	1500	1500	1500	1500
	1375	1100	1250	1100	1100	1000	1000	940	1178		1100	1250	1100	1365
	1250	960	1000	960	960	875	875	820	1000		900	950	900	1180
	1000	900	900	900	900	850	850	800	900		800	800	800	1000
	900	860	625	800	800	800	800	671	800		675	633	675	900
	625	500	500	643	643	750	750	400	600		600	538	600	790
	500	373	440	500	500	675	675	209	500		500	477	500	680
	440		375	373	373	500	500		440			438		500
	375		270			373	373		363			250		355
	270								325					
								250						

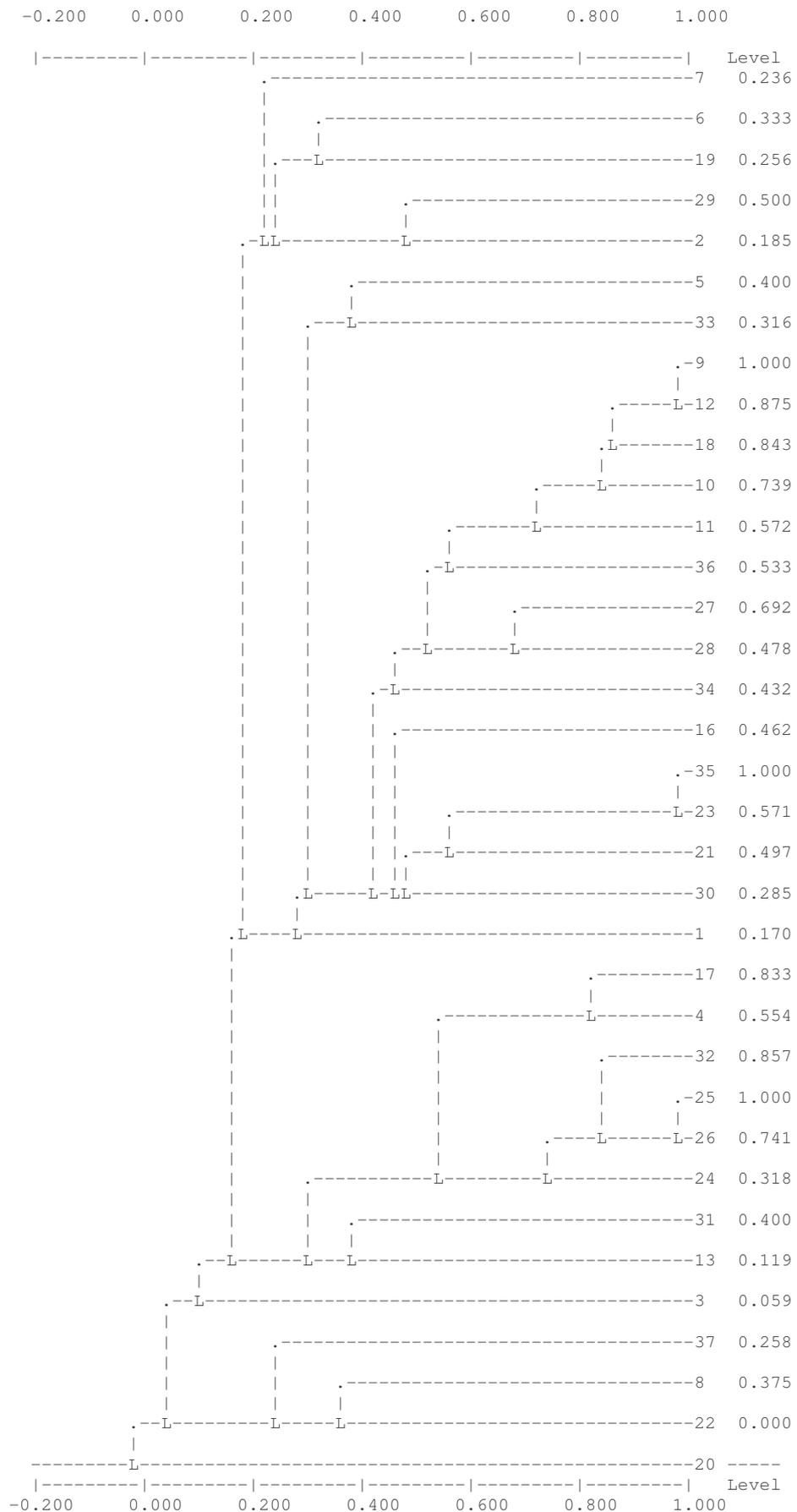
Anexo 6 Peso molecular das bandas presentes nos géis consideradas para análise dos produtos de RAPD utilizando o *primer 6*

N° das Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	17	18	19	20	21	22	23
N° de bandas >1500bp	6	2	3	3	2	1	1	3	3	2	4	3	2	2	3	3	2	4	4	1	2
Peso Molecular (bp)	1500	1350	800	800	1300	1500	1500	1500	1500	1300	1500	1500	1300	1300	1500	1500	1300	1100	1100	1300	1300
	800	1100					900	900	1250	1100	1250	1250	1000	1100	1250	1250	1100	700	700	1000	1100
		900					750	800	975	950	975	975	800	900	700	975	700	600	600	600	700
		600					331	533	700	700	700	700	650	700	667	700	600	500	500	567	600
		500							667	550	500	667		600	500	667	550			500	500
									500	500		500		500	322	500	500			329	

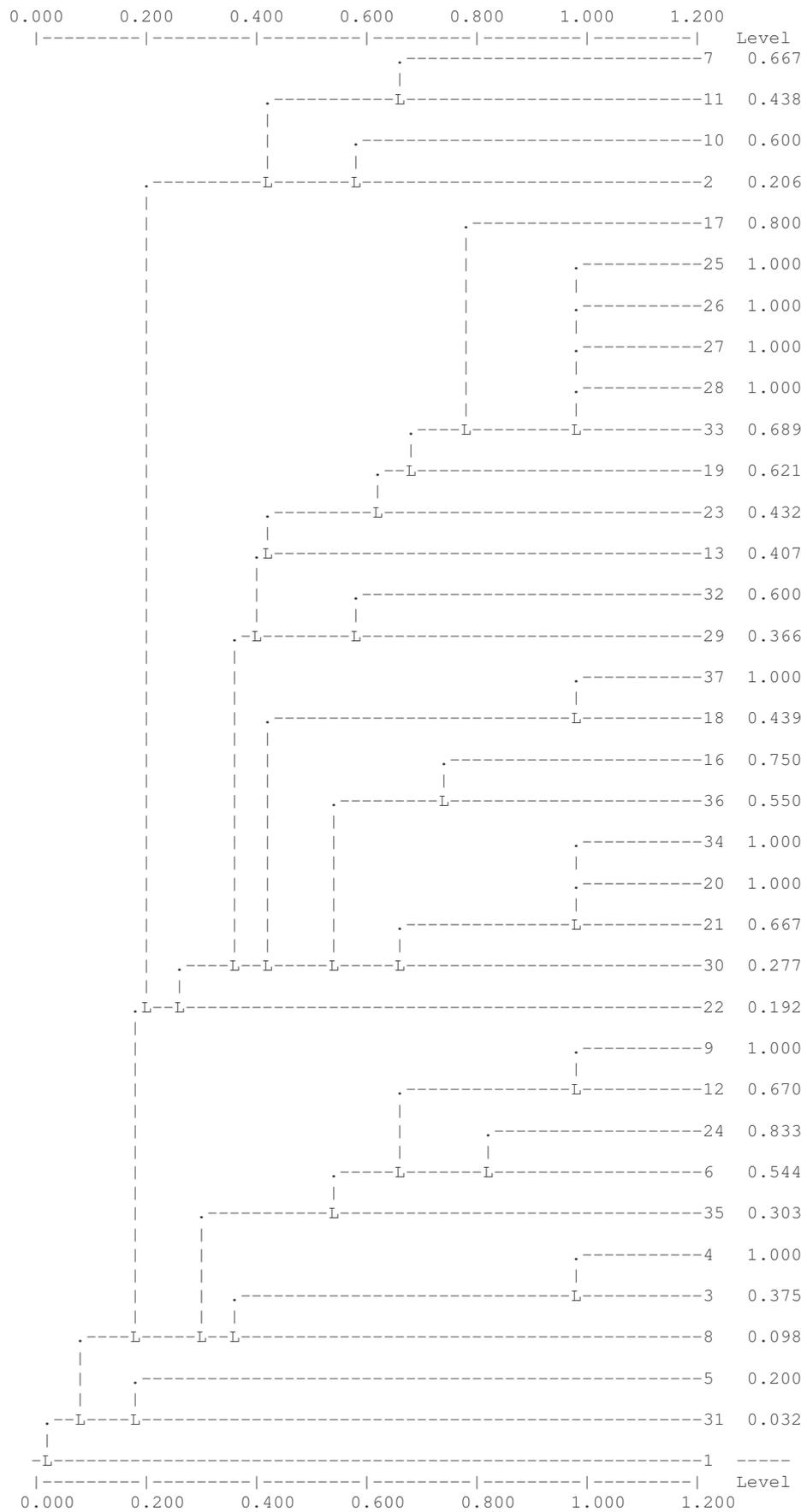
N° das Amostras	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
N° de bandas >1500bp	2	2	2	4	3	4	4	1	3	4	2	2	5	4
Peso Molecular (bp)	1300	1300	1300	1500	1300	1300	1300	1500	1500	1100	1300	1300	1500	1500
	1100	1100	1100	1389	1100	1100	1100	700	1250	700	1100	1100	880	1250
	700	700	700	880	1000	950	950		975	600	700	700	800	1000
	600	600	600	800	700	700	700		700	500	600	600	600	800
	500	500	500		600	500	500		667		500	500		600
					500				550					
					400				500					



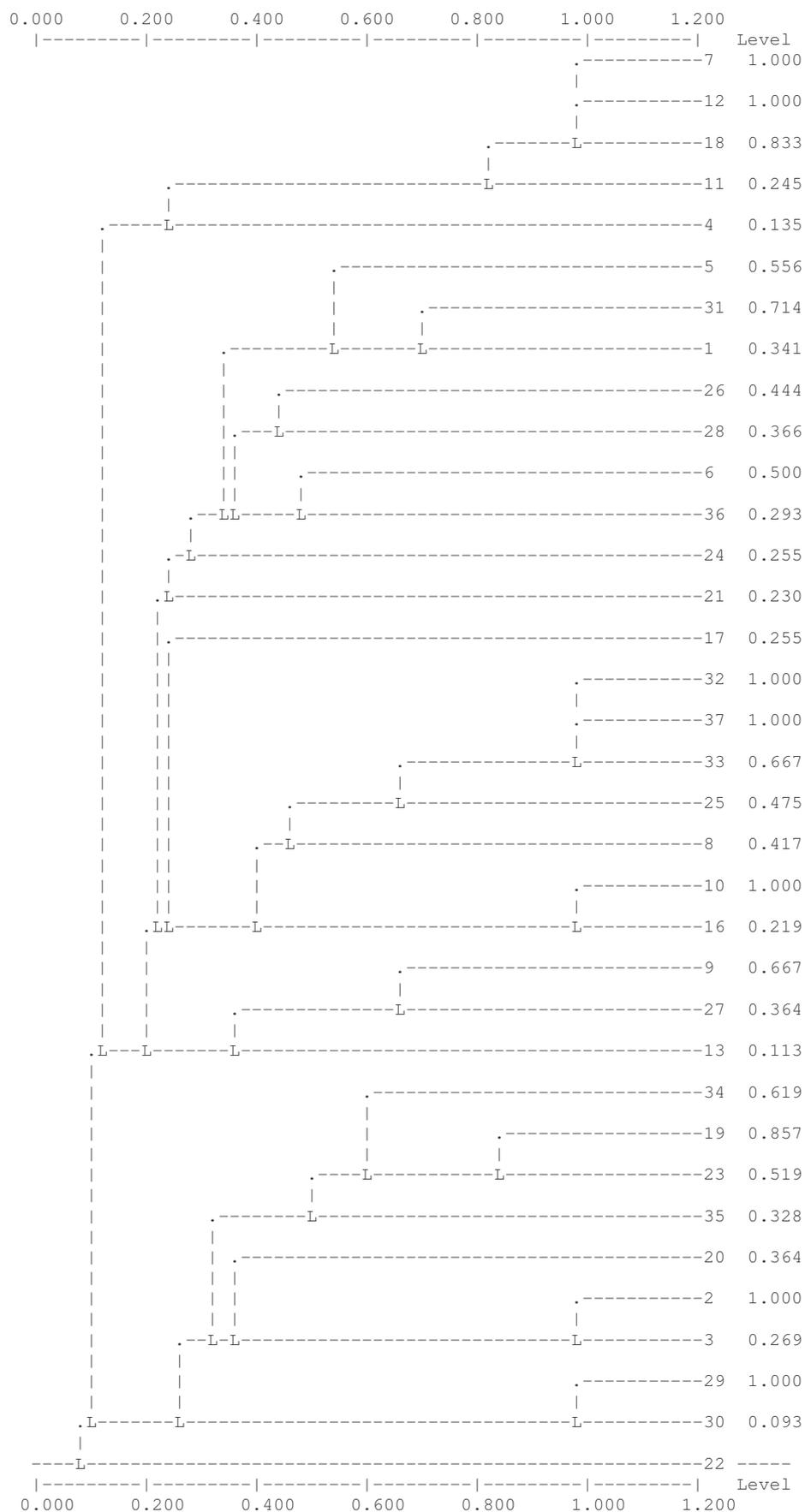
Anexo 7 Perfil filogenético das amostras de *Salmonella* spp. com o primer 1



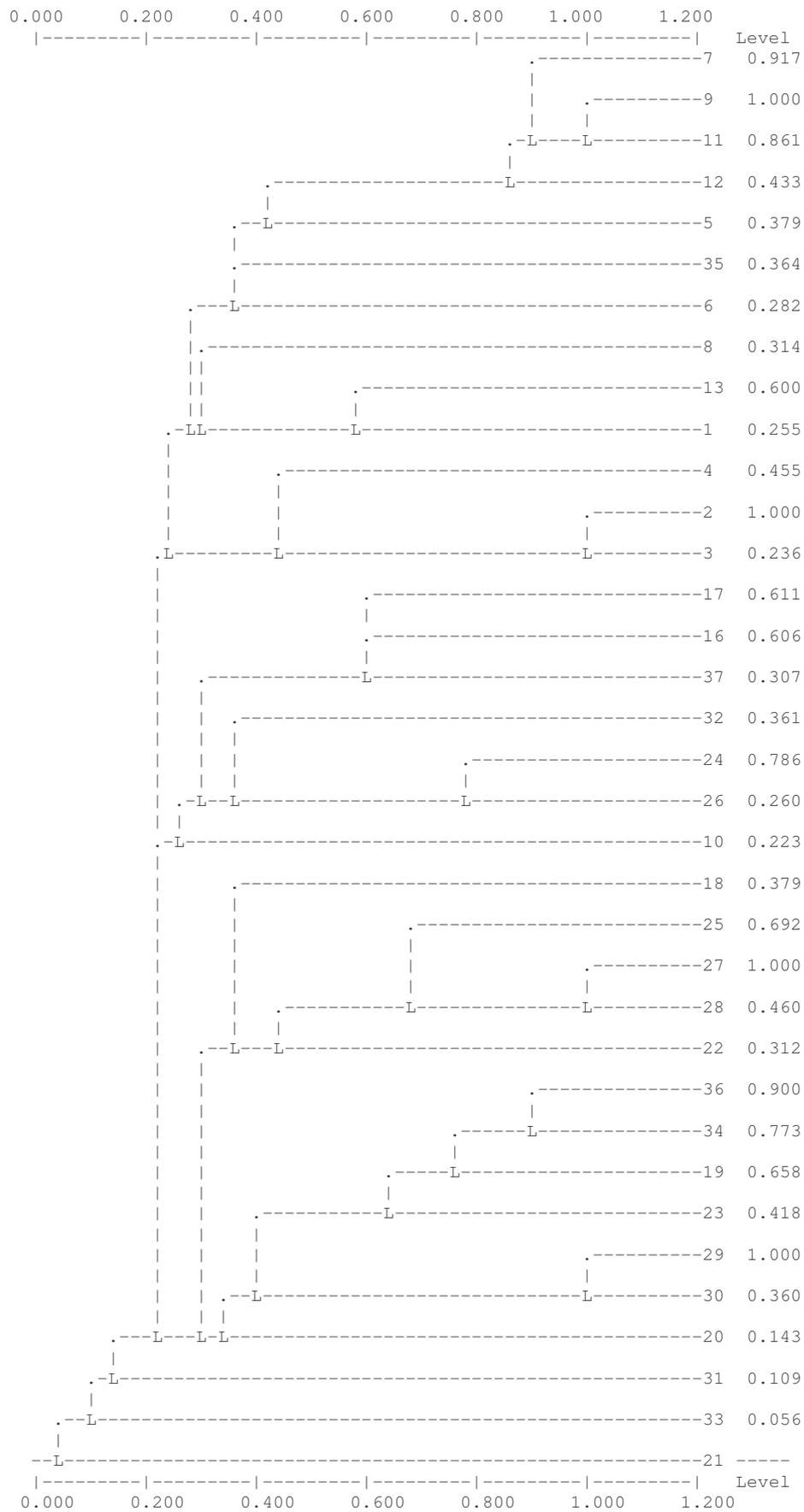
Anexo 8 Perfil filogenético das amostras de *Salmonella* spp. com o primer 2



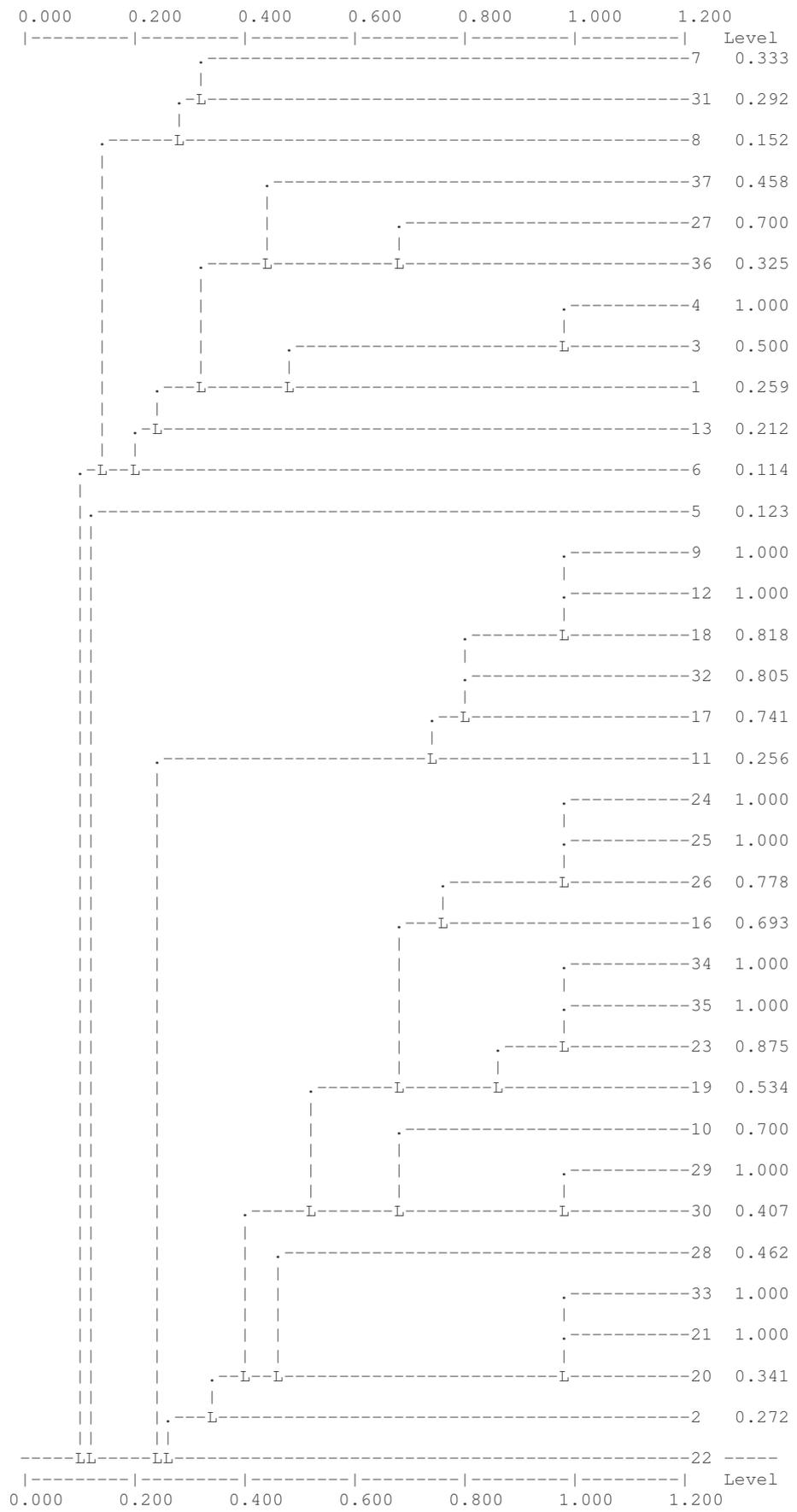
Anexo 9 Perfil filogenético das amostras de *Salmonella spp.* com o *primer 3*



Anexo 10 Perfil filogenético das amostras de *Salmonella* spp. com o primer 4



Anexo 11 Perfil filogenético de amostras de *Salmonella* spp. com o primer 5



Anexo 12 Perfil filogenético de amostras de *Salmonella spp.* com primer 6