

Métodos de caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* Enteritidis e a utilidade da técnica PFGE em estudos epidemiológicos

Methods of phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis and the usefulness of PFGE technique in epidemiologic studies

Luciana Bill Mikito Kottwitz¹ e Tereza Cristina R. M. de Oliveira¹

¹Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Endereço para correspondência:

Luciana Bill Mikito Kottwitz

Rua Afonso Pena, 2229, Cascavel/PR, CEP 85.813-300, Fone (45) 3038-1429,

e-mail: lukottwitz@yahoo.com.br

Resumo

No Brasil, *Salmonella* é a causa mais frequente de infecção de origem alimentar. *Salmonella* Enteritidis (SE) é um dos sorovares mais comumente associados à morbidade e mortalidade em humanos. A vigilância epidemiológica de SE exige métodos eficazes para tipagem e investigação da diversidade e origem genética dos isolados, considerando o elevado grau de homogeneidade genética deste sorovar. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica referente à caracterização fenotípica e genotípica, bem como a aplicação da técnica de macrorestrição do DNA cromossômico seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) na caracterização molecular de SE visando um melhor entendimento da sua epidemiologia. Os principais critérios na escolha de métodos para tipificação de SE incluem a capacidade do método em tipificar todas as linhagens analisadas, a reprodutibilidade do ensaio e o poder de discriminação. Devido a sua grande utilidade na análise epidemiológica para diferenciação de cepas patogênicas e no monitoramento de sua distribuição, PFGE tem sido considerado o método “Padrão-Ouro” entre os diferentes métodos de tipagem molecular de várias espécies bacterianas, tornou-se um método padrão entre laboratórios de saúde pública, devido à sua acurácia e reprodutibilidade entre os diferentes laboratórios. Este método permite, também, a diferenciação de isolados caracterizados como idênticos por outras análises como sorotipagem, fagotipagem, ribotipagem e análise de plasmídeos, constituindo-se uma ferramenta de grande valia na vigilância epidemiológica da salmonelose.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, eletroforese em campo pulsado, PFGE, caracterização molecular

Abstract

In Brazil, *Salmonella* is the most common cause of foodborne disease. *Salmonella* Enteritidis (SE) is one of the serovars most commonly associated with morbidity and mortality in humans. Epidemiological surveillance of SE requires effective methods for typing and inquiries of diversity and genetic origin from the isolated, considering the high degree of genetic homogeneity of this serovar. Therefore, the objective of this study was to do a literature review on the phenotypic and genotypic characterization as well as the application of the technique macrorestriction of chromosomal DNA followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in the SE molecular characterization, seeking a better understanding of its epidemiology. The main criteria in choosing methods for classifying SE include the ability of the method to characterize all strains analyzed, the reproducibility of the test and the power of discrimination. Due to its great usefulness in epidemiological analysis for differentiation of pathogenic strains and monitoring of its distribution, PFGE has been considered as the "Gold Standard" among the different methods of molecular typing of several bacterial species and has become a standard method of public health laboratories, because of its accuracy and reproducibility among different laboratories. This method also allows the differentiation of isolated, characterized as identical to other analysis such as serotyping, phage typing, ribotyping and plasmid analysis, becoming a valuable tool for epidemiologic surveillance of salmonellosis.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, pulsed-field gel electrophoresis, PFGE, molecular characterization

INTRODUÇÃO

A salmonelose é considerada uma das mais importantes zoonoses e uma das principais enfermidades transmitidas por alimentos (ETAs)^(1,2,3).

De acordo com dados da Secretaria de Vigilância em Saúde, do Ministério da Saúde, *Salmonella* spp. foi responsável por 1.122 (23,8%) dos 4.716 surtos investigados no Brasil, no período de 1999 a 2005. No Estado do Paraná, 267 (43,8%) dos 609 surtos que ocorreram de 2000 a 2005 foram causados por este patógeno⁽⁴⁾.

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) é um dos sorovares mais comumente associados à morbidade e mortalidade em humanos^{5,6,7}. A maioria dos surtos tem sido associada a produtos de origem animal, principalmente carne de aves e ovos e seus derivados^(3, 8, 9,10).

A vigilância epidemiológica de *Salmonella* Enteritidis exige métodos eficazes para subtipagem e investigação da diversidade e origem genética dos isolados⁽¹¹⁾, considerando o elevado grau de homogeneidade genética deste sorovar^(10,12,13,14).

Diferentes métodos de tipificação tem sido padronizados para caracterizar cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos. Estes métodos incluem a tipagem fenotípica através de técnicas como fagotipagem e análise do perfil de resistência antimicrobiana, que são frequentemente complementados com técnicas moleculares de análise do DNA, como perfil plasmidial, polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (*Random amplified polymorphic DNA* – RAPD), ribotipagem e análise de macrorestrição do DNA cromossômico seguido de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed field gel electrophoresis* – PFGE)^(5, 9,15).

Os principais critérios na escolha de métodos para tipificação de *S. Enteritidis* incluem a capacidade do método em tipificar todas as linhagens analisadas, a reprodutibilidade do ensaio e o poder de discriminação⁽¹⁶⁾. A macrorestrição de DNA seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) é considerada a metodologia de

referência para caracterização molecular deste sorovar, em razão da reprodutibilidade dos resultados¹⁷, estabilidade dos perfis gerados e seu poder discriminatório⁽¹⁸⁾.

O objetivo deste trabalho é apresentar uma revisão da literatura, sobre os métodos de caracterização de *S. Enteritidis* e os principais aspectos da utilização da técnica PFGE como ferramenta para caracterização molecular desse sorovar.

Métodos de Caracterização Fenotípica de *Salmonella Enteritidis*

Os métodos fenotípicos clássicos utilizados como primeira diferenciação entre cepas do sorovar *Enteritidis* compreendem a fagotipagem e a análise do perfil de resistência a antimicrobianos^(9,18,17).

Na fagotipagem determina-se a reatividade das culturas a um conjunto de fagos líticos (bacteriófagos) selecionados e em diluições apropriadas. Os bacteriófagos são vírus que infectam bactérias hospedeiras sensíveis, se replicam dentro das mesmas e provocam sua lise. O padrão de tipagem produzido divide as cepas do sorotipo em variantes resistentes ou sensíveis aos fagos^(1,19).

A técnica de fagotipagem apresenta algumas deficiências como a possibilidade de ocorrer a conversão de fagotipos e uma habilidade de tipar inferior a 100%, porque nem todos os organismos podem ser atribuídos a um fagotipo conhecido⁽¹¹⁾. Outro inconveniente é que o método usualmente não pode ser conduzido em laboratórios convencionais^(14,18,20). Apesar de ser uma técnica muito útil para subdividir as cepas de *S. Enteritidis* de diferentes origens, a fagotipagem tem demonstrado discriminação insuficiente quando apenas um fagotipo predomina em determinada área geográfica^(6,9,11,21).

Alguns fagotipos (PTs) são mais estáveis e outros menos, contudo mudanças podem ocorrer como resultado da aquisição de plasmídios ou fagos⁽²²⁾, mudanças na expressão de lipopolissacarídeos ou mutação espontânea afetando o conjunto de receptores de fagos⁵. Alguns pesquisadores relataram a conversão de cepas do PT4 para PT24, pela aquisição de um plasmídio de resistência (plasmídio R) à ampicilina, estreptomicina e tetraciclinas²³, e outros citam a conversão de cepas dos PTs 23 e 14b para PT8⁽²⁴⁾.

Outro método que pode ser utilizado para subtipagem, e que vem se tornando cada vez mais importante, é a análise do perfil de resistência a antimicrobianos⁽¹⁸⁾. Além da utilidade como marcador epidemiológico, é uma ferramenta útil na identificação da emergência de linhagens resistentes. Os surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados sugerem a possibilidade de transmissão destas linhagens pela cadeia alimentar. Como consequência, ocorre o aumento de falhas no tratamento de pacientes e da severidade das infecções^(17,25).

Testes de sensibilidade a antimicrobianos compreendem ainda uma ferramenta útil na investigação epidemiológica de surtos. Contudo, o uso da técnica isoladamente para estudos epidemiológicos tem limitação devido às variações fenotípicas e à pressão seletiva à qual o patógeno está exposto. A resistência a antimicrobianos geralmente decorre da aquisição de genes de virulência carregados por plasmídeos ou transposons, transferidos entre linhagens da mesma espécie ou entre diferentes espécies. Na ausência de pressão seletiva, estes elementos podem ser perdidos. Assim, linhagens diferentes podem desenvolver padrões de resistência semelhantes, ao mesmo tempo que isolados pertencentes à mesma linhagem podem diferir no perfil de sensibilidade⁽¹⁷⁾.

Técnicas fenotípicas são limitadas pela possibilidade de alteração da expressão gênica ou diante da dominância de determinados sorovares e fagotipos, o que é freqüente em SE e é influenciado pelo caráter clonal do patógeno⁽¹⁷⁾. Uma vez que, os

isolados de SE são difíceis de subtipificar ⁽²⁶⁾, os métodos tradicionais e os métodos moleculares devem ser associados para um estudo epidemiológico efetivo ⁽⁶⁾.

Métodos de Caracterização Genotípica de *Salmonella* Enteritidis

Os métodos de tipagem genotípica ou molecular, os quais envolvem a análise direta do DNA de elementos genéticos cromossômicos ou extra-cromossômicos, permitem a diferenciação clonal de cepas. Um clone bacteriano pode ser definido como uma população de células apresentando muitas características idênticas, cuja explicação para esta identidade seria que todas as cepas se originam de um ancestral comum. Os métodos moleculares têm sido utilizados, principalmente, em combinação com métodos padrões bem estabelecidos, como a sorotipagem e a fagotipagem para finalidades epidemiológicas, permitindo a diferenciação de cepas epidêmicas das não epidêmicas ⁽²⁾.

O conhecimento dos clones de patógenos, a evolução de sua distribuição, incidência e prevalência espacial e temporária são subsídios importantes para o controle da doença e de seu agente. Essencial também é estabelecer os reservatórios naturais dos clones e identificar as fontes de contaminação nos surtos e nos casos esporádicos ⁽²²⁾.

Métodos que pesquisam diferenças a nível molecular ganharam importância a partir dos anos 80. Porém, mesmo alguns desses métodos apresentam baixo poder discriminatório para o sorovar Enteritidis ⁽¹⁸⁾. Esses métodos de tipagem moleculares apresentam muitas vantagens sobre as técnicas convencionais. Uma das mais importantes é que todas as bactérias são tipáveis; outro aspecto importante é que o poder discriminatório dos métodos baseados em análise de DNA é maior que o dos procedimentos fenotípicos ⁽²⁷⁾. Entretanto, nenhuma abordagem molecular combina reprodutibilidade e poder discriminatório com rapidez e simplicidade ^(27,28).

A importância do desenvolvimento de marcadores moleculares para caracterizar cepas de *Salmonella* e relacionar os surtos com suas fontes de origem, em razão da prevalência de determinados fenótipos tem sido verificada. Entre os muitos métodos utilizados para determinar estes marcadores estão: a técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”), a análise do perfil plasmidial ⁽²⁾, polimorfismo de fragmentos de restrição (RFLP), *Fluorescent amplified fragment length polymorphism* (FAFLP), amplificação randômica polimórfica de DNA (RAPD), ribotipagem e o estudo genômico por eletroforese em campo pulsado (PFGE – “Pulsed-field gel electrophoresis”) ^(5, 29).

A Análise do perfil plasmidial envolve, inicialmente, a extração dos plasmídeos, moléculas circulares de DNA dupla-fita que se replicam autonomamente em uma célula bacteriana hospedeira. Eles variam em tamanho e contém genes que codificam resistência aos antimicrobianos e fatores de virulência. Após a extração, os eventuais diferentes plasmídeos, presentes em cada amostra bacteriana, são separados por eletroforese em gel de agarose, determinando-se o número e o tamanho dos plasmídeos. Informação adicional pode ser obtida pela digestão do DNA plasmidial com enzimas de restrição e posterior comparação do número e tamanho de fragmentos resultantes, ou seja, análise do perfil de restrição plasmidial ⁽²⁾.

A subtipagem de SE através do perfil plasmidial é importante, já que, alguns plasmídios de *Salmonella* carregam genes responsáveis pelos fatores virulência bacteriana ⁽³⁰⁾. É um método tradicional usado em estudos epidemiológicos, porém, não é tão discriminatório como a fagotipagem para a subdivisão primária de um sorovar ⁶.

Este método também tem mostrado ser limitado para a subdivisão de SE PT4, visto que muitas cepas carregam um simples plasmídeo 38-Mda^(31,32).

O perfil plasmidial apresenta limitação inerente ao fato de que plasmídios são elementos extra-cromossomais que podem ser espontaneamente perdidos ou prontamente adquiridos. Consequentemente, isolados epidemiologicamente relacionados podem apresentar perfis plasmidiais diferentes⁽¹⁷⁾.

Muitas das técnicas moleculares correntemente usadas para tipificação, baseiam-se na separação eletroforética de fragmentos de DNA. A eletroforese resultante é representada por um perfil de bandas sobre um gel. Visto que estes perfis resultantes são extremamente complexos, a facilidade de interpretação e a inter-relação dos resultados vão determinar se o método de tipagem terá utilidade na caracterização⁽¹⁶⁾.

A técnica RFLP – polimorfismo de fragmentos de restrição tem sido usada por anos para detectar e localizar sequências genômicas de uma variedade de organismos procariontes e eucariontes. Para a detecção de genes específicos, o DNA cromossomal é digerido por enzimas de restrição apropriadas, e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose são hibridizados com sondas específicas¹⁶. Para SE, tem sido usado principalmente IS 200⁽³⁰⁾, porém a técnica é limitada pelo fato deste sorovar albergar um pequeno número de cópias IS200^(31,33).

Fluorescent amplified fragment length polymorphism (FAFLP) é uma variante da técnica de PCR original, usada para genotipagem de alta resolução de *E. coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Streptococcus pyogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. Estudos de FAFLP de SE previamente reportados mostraram eficiência na discriminação entre cepas dentro do mesmo fagotipo, a qual é necessária para análise de surtos e vigilância epidemiológica^(34,35).

Métodos recentemente desenvolvidos para ribotipagem de microrganismos, os quais usam as enzimas de restrição *PstI* e *SphI* (PS) têm mostrado serem úteis para subtipar fagotipos de SE, incluindo PT4⁽²⁶⁾. Ribotipagem resulta em um pequeno número de bandas, a qual simplifica a interpretação. Contudo, isto também limita a capacidade da técnica de distinguir entre cepas estreitamente relacionadas. A técnica pode ser aplicada com sucesso para diferenciar cepas de bactérias que manifestam alto grau de heterogenicidade dentro do operon rRNA⁽¹⁶⁾.

A amplificação randômica polimórfica de DNA (RAPD) é baseada no uso de curtas sequências (9 a 10 pares de base) de primers ao acaso, as quais hibridizam em baixa temperatura de anelamento com sequências de DNA cromossomal, dando início a amplificação de regiões do genoma bacteriano^(16,36). O número e a localização destes oligonucleotídeos iniciadores dispostos ao acaso varia para cepas de uma mesma espécie bacteriana⁽¹⁶⁾, sendo que alguns nucleotídeos são ferramentas úteis para evidenciar a diversidade genômica de *Salmonella*⁽³⁶⁾.

Embora diversos métodos para discriminação de SE tenham sido desenvolvidos e amplamente utilizados, muitos pesquisadores tem relatado que PFGE é a melhor escolha para análise de SE⁹.

A técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE) é baseada na análise do genoma completo através da digestão por endonuclease de restrição e é, geralmente, considerada padrão para tipagem de *Salmonella* sendo muito útil na investigação de salmoneloses^(36,37). Para subtipar cepas de *Salmonella*, PFGE apresenta boa discriminação das cepas para alguns sorovares de *Salmonella*, incluindo *S. Enteritidis*⁽³⁸⁾.

Caracterização Molecular de *Salmonella* Enteritidis através da Técnica de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A macrorestrição do DNA cromossômico seguida de eletroforese em campo pulsado (PFGE) foi primeiramente descrita em 1984 como uma ferramenta para análise do DNA cromossômico de organismos eucarióticos⁽³⁹⁾.

O método PFGE consiste na clivagem do genoma bacteriano com enzimas de restrição que reconhecem poucos sítios ao longo do DNA cromossômico, cortando-o aleatoriamente e gerando de 10 a 30 fragmentos de restrição que variam de 10 a 800 kb. Esses fragmentos grandes de DNA não podem ser separados por eletroforese convencional. Na eletroforese em gel de agarose em campo pulsado, a orientação do campo elétrico é modificada periodicamente, permitindo que fragmentos de até duas megabases sejam separados efetivamente por diferença de tamanho^(28,40,41).

Para interpretar os perfis genéticos gerados pela técnica PFGE e utilizar esta informação para fins de estudos epidemiológicos, é necessário comparar os padrões PFGE e compreender que eventos genéticos ocorridos ao acaso, podem alterar estes perfis e diferenciar os isolados em quatro categorias: geneticamente indistinguíveis, estreitamente relacionadas, possivelmente relacionadas e não relacionadas epidemiologicamente. Essa diferenciação permite associar a origem e as rotas de transmissão de patógenos⁽⁴²⁾.

PFGE tem sido considerado o método “Padrão-Ouro” entre os diferentes métodos de tipagem molecular de várias espécies bacterianas^(16,43) devido a sua utilidade na diferenciação de cepas patogênicas e no monitoramento de sua distribuição na comunidade⁽⁴⁰⁾. PFGE tornou-se um método padrão entre laboratórios de saúde pública, devido à sua acurácia e reprodutibilidade^(40,44). Este método permite a diferenciação de isolados caracterizados como idênticos por outras análises como sorotipagem, fagotipagem, ribotipagem, análise de plasmídeos, entre outras^(13,43).

Atualmente, PFGE é um dos métodos mais importantes utilizados na subtipagem de diversos microrganismos, inclusive *Salmonella*^(9,18).

Pesquisas tem mostrado que PFGE é um método eficiente e estável na discriminação intra-sorovares^(5,29,45,46).

A necessidade da utilização de métodos que apresentem capacidade de discriminação além de sorovares é reforçada pelo fato de alguns fagotipos de SE predominarem em determinadas regiões geográficas⁽¹¹⁾ e pela observação de que, isolados de SE de um mesmo fagotipo podem apresentar diferenças em sua estrutura genômica e nas suas características de virulência⁽¹²⁾.

Redes de vigilância epidemiológica de *S. Enteritidis*, entre elas PulseNet nos Estados Unidos, onde o Brasil está incluído⁽¹⁰⁾, e Salm-gene/Enter-net na Europa^(47,48), utilizam PFGE para caracterização de linhagens desse sorovar⁽¹⁷⁾.

Embora diferentes linhagens tenham sido associadas a surtos na Europa e EUA, acredita-se que *S. Enteritidis* tenha surgido da expansão clonal de um único isolado mais virulento, devido ao caráter epidêmico de sua ocorrência⁽³⁰⁾.

Devido à estabilidade dos perfis gerados e ao seu poder discriminatório, o método se mostra adequado para a criação de bases de dados, uma tendência atual na pesquisa epidemiológica^(15,16). As bases de dados podem armazenar os perfis genéticos submetidos, permitindo um acompanhamento epidemiológico não apenas em escala regional, mas também a nível nacional ou internacional⁽⁴⁹⁾.

Embora linhagens de SE pertencentes ao fagotipo PT4 sejam consideradas extremamente homogêneas⁽⁵⁰⁾, diversas pesquisas têm afirmado a capacidade de diferenciação intra-fagotipos através de PFGE^(9,32,33,43,45). A técnica é descrita como

capaz de evidenciar diferenças menores entre clones, portanto adequada para uso como ferramenta de genotipificação ⁽¹⁷⁾.

O poder discriminatório de PFGE tem sido verificado em cepas de um mesmo sorovar de *Salmonella* implicadas em surtos. Geralmente, todas as cepas epidemiologicamente relacionadas, ou seja, isoladas de diferentes fontes, porém, no mesmo período de tempo e local, apresentam perfil de restrição idêntico, refletindo clonalidade das cepas, independente da enzima de restrição utilizada na digestão do DNA cromossômico ⁽²⁾.

Na investigação de surtos de salmonelose, causados pelo consumo de alimentos contaminados, PFGE permite a determinação da relação entre os isolados de pacientes e de alimentos, auxiliando assim a identificação da fonte de contaminação ^(5,13,17). Através da técnica de PFGE, pesquisadores puderam relacionar a origem de surtos de salmonelose humana causados por fagotipos pouco frequentes, PT9a e PT11, analisando isolados obtidos de animais silvestres os quais se apresentaram genotipicamente indistinguíveis daqueles isolados humanos, identificando desta maneira a fonte de contaminação ⁽⁴⁶⁾.

Alguns autores demonstraram a estreita relação epidemiológica entre isolados de pacientes e a dieta enteral associada a um surto ocorrido em um hospital, através da análise PFGE ⁽⁸⁾.

Ainda, utilizando a mesma técnica, pesquisadores determinaram a correlação epidemiológica de isolados de SE presentes em ovos líquidos contaminados, rastreando a cadeia de produção destes alimentos ⁽⁴³⁾.

A endonuclease *Xba* I é apontada em várias pesquisas como a enzima de restrição com maior poder discriminatório para cepas de SE ^(5,9,10,31,43,45, 46,51,52). A grande maioria dos trabalhos que envolvem a análise de SE por PFGE utilizam protocolos padronizados com esta enzima. Deste modo, é obtido um grau satisfatório de discriminação entre as linhagens e é possível comparar os perfis obtidos por diferentes grupos de pesquisa que utilizam o mesmo protocolo e as mesmas condições de macrorestrição e PFGE ¹⁷. No entanto, a possibilidade de obter maior poder discriminatório é aumentada com a utilização de diferentes enzimas com sítios raros de restrição ^(40,53).

Considerações Finais

O grau de polimorfismo genômico na população microbiana é um fator muito importante para epidemiologia molecular. A suposição da natureza clonal de alguns fagotipos de SE é um problema na escolha do método molecular a ser utilizado na discriminação de isolados. Como consequência, técnicas muito eficientes são necessárias para detectar pequenas diferenças no genótipo dos mesmos. Em geral, PFGE é a técnica de escolha para muitas espécies microbianas, incluindo SE, por apresentar maior reprodutibilidade e maior poder discriminatório. As dificuldades associadas a sua utilização são relacionadas ao custo do equipamento e do ensaio e o tempo necessário para a realização das análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. POPOFF, M. Y., LE MINOR, L. E.. The genus *Salmonella*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT (Editors). *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed.; Vol. 2, Springer, New York, USA, p.764-799. 2005.
2. TAVECHIO, A.T. Comparação fenotípica e genotípica entre cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo 1,4,[5],12:i:- e de *Salmonella* Typhimurium São Paulo. 2006. 147 p. Tese [Doutorado em Ciências]
3. GHILARDI, A. C.R., TAVECHIO, A. T., FERNANDES, S.A. Antimicrobial susceptibility, phage types, and pulsetypes of *Salmonella* Typhimurium, in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(3): 281-286, May 2006
4. GERMANO, P.M.L.; GERMANO M.I.S. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 3.ed.rev. e ampl. 986 p. São Paulo: Manole, 2008.
5. AHMED, R. SOULE, G., DEMCZUK, W.H., CLARK, C., KHAKHRIA, R., RATNAM,S., MARSHALL, S., NG, L.K., WOODWARD, D.L., JOHNSON, W.M., RODGERS, F.G. Epidemiologic Typing of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in a Canadá-Wide Outbreak of Gastroenteritis due Contaminated Cheese. *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 38, n.6, 2403-2406, june 2000.
6. FERNANDES, S.A.; GHILARDI, A.C.R.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 45:59-63, 2003.
7. KIRK,M.D., LITTLE, C.L., LEM., M., FYFE, M., GENOBILE, D., TAN, A., THRELFALL, J., PACCAGNELLA, A., LIGHTFOOT, D., LYI, H., McINTYRE, L.M., WARD, L., BROWN, D.J., SURNAM, S., FISHER I.S.T. An outbreak due to peanuts in their shell caused by *Salmonella enterica* serotypes Stanley and Newport – sharing molecular information to solve international outbreaks. *Epidemiology and Infection*, 132, p.571-577, 2004.
8. MATSUOKA, D.M.; COSTA, S.F.; MANGINI, C.; ALMEIDA, G.M.D.; BENTO, C.N.; VAN DER HEIJDEN, I.M.; SOARES, R.E.; GOBARA, S.; TÁVORA, L.G.F.; LEVIN, A.S. A nosocomial outbreak of *Salmonella Enteritidis* associated with lyophilized enteral nutrition. *The Journal of Hospital Infection*, v.58, p.122-127, 2004.
9. WOO, Y.K. Finding the Sources of Korean *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 Isolates by Pulsed-field Gel Electrophoresis. *Journal of Microbiology*, 43:424-429, 2005.
10. ZHENG, J.; KEYES, C.E.; ZHAO, S.; MENG, J.; BROWN, E.W. Enhanced subtyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Emerging Infectious Diseases*, v.13, n.12, p.1932-1935, 2007.

11. LIEBANA, E.; GARCIA-MIGURA, L.; BRESLIN, M.F., DAVIES, R.H.; WOODWARD, M.J. Diversity of strains of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis from English poultry farms assessed by multiple genetic fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.39, n.1, p.154-161, 2001.
12. WEIDE-BOTJES, M.; KOBE, B.; SCHWARZ, S. Inter- and intra-phage type differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates using molecular typing methods. *Zentralblatt für Bakteriologie*, Stuttgart, v.288, p.181- 193, 1998.
13. MURAKAMI, K. et al. Environmental survey of *Salmonella* and comparison of genotypic character with human isolates in Western Japan. *Epidemiology and Infection*, v. 126, p. 159-171, 2001.
14. BOXRUD, D.; PEDERSON-GULRUD, K.; WOTTON, J.; MEDUS, C.; LYSZKOWICZ, E.; BESSER, J.; BARTKUS, J.M. Comparison of Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis, pulsed-field gel electrophoresis, and phage typing for subtype analysis of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.45, n.2, p.536-543, 2007.
15. LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I.; GARAIZAR, J. 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*, Amsterdam, v.40, p.27-34, 1998.
16. OLIVE, D.M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.
17. VAZ, C.S.L. Determinação da Diversidade Fenotípica e Genotípica de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis no Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 135p. Tese [Doutorado em Ciências Veterinárias]. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.
18. ANDRIGHETO, C. Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica. São Paulo. 2006. 99p. Tese [Doutorado em Ciência dos Alimentos] - Universidade de São Paulo. SP.
19. WARD, L.R.; DE SA, J.D.H.; ROWE, B. A phage typing scheme for *Salmonella enteritidis*. *Epidemiology and Infection*, n.99, p.291-294, 1987.
20. LANDERAS, E.; GONZÁLES-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Molecular epidemiology of *Salmonella* serotype Enteritidis: relationships between food, water and pathogenic strains. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v.43, p.81-90, 1998.

21. FERNANDES S.A. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas no Estado de São Paulo (1993-2000). [doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina-UNIFESP; 2004.
22. NUNES, I.A. *Salmonella* Enteritidis – fagotipos, susceptibilidade a drogas antimicrobianas e epidemiologia molecular baseada na sonda complementar ao rRNA. São Paulo, 1999. 129p. Tese de Doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo.
23. FROST, J.A.; WARD, L.R.; ROWE, B. Acquisition of a drug resistance plasmid converts *S. Enteritidis* phage type 4 to phage type 24. *Epidemiology and Infection*, V.103, p.243-248, 1989.
24. HICKMAN-BRENNER, F.W.; STUBBS, A.D.; FARMER III, J.J. Phage Typing of *Salmonella* Enteritidis in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 2817-2823, 1991.
25. ÂNGULO, F.J.; NARGUND, V.N., CHILLER, T.C. Evidence of no association between use of antimicrobial agents in foods animals and antimicrobial resistance among bacteria isolated from human and the human consequences of such resistance. *Journal of Veterinary Medicine*. V. 51, p. 474-379, 2004.
26. CLARK, C. G., M. TERNER, J. SPREITZER, AND F. RODGERS. 2005. Emergence of *Salmonella* 4,5,12:i:- in Canada and characterization of the genetic events responsible. 2005 Abstracts presented at the AMMI Canada – CACMID 2005 Annual Conference held in Ottawa, Ontario, April 14-17. (http://www.cacmid.ca/abstracts_2005.htm).
27. FARBER, J.M. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*, Dês Moines, v.59, n.10, p.1091-1101, 1996.
28. TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v.18, n.6, p.426-439, 1997.
29. TASSIOS, P. T.; MARKOGIANNAKIS, A.; VATOPOLOUS, A. C.; KATSANIKOU, E.; VELONAKIS E. N.; KOUREA-KREMASTIMOU, J.; LEGAKIS N. J. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella* Enteritidis during a 7 years period in Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, p. 1316-1321, 1997.
30. HELMUTH, R.; SCHROETER, A. Molecular Typing Methods for *S. Enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, v.21, p.69-77, 1994.
31. RIDLEY, A.M.; THRELFALL, E.J.; ROWE, B. Genotypic characterization of *Salmonella enteritidis* phage types by plasmid analysis, ribotyping, and pulsedfield gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.36, n.8, p.2314-2321, 1998.
32. LUKINMAA, S.; SCHILDT, R.; RINTTILÄ, T.; SIITONEN, A. *Salmonella* Enteritidis phage types 1 and 4: pheno- and genotypic epidemiology of recent outbreaks *Biosaúde*, Londrina, v. 13, n. 1 / 2, 2011

in Finland. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.37, n.7, p.2176-2182, 1999.

33. LIEBISCH, B.; SCHWARZ, S. Molecular typing of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates. *Journal of Medical Microbiology*, Reading, v.44, p.52-59, 1996.

34. SCOTT, F.; THRELFALL, J.; STANLEY, J.; ARNOLD, C. Fluorescent amplified fragment length polymorphism genotyping of *Salmonella* Enteritidis: a method suitable for rapid outbreak recognition. *Clinical Microbiology and Infection*, v.7, n.9, p.479-485, 2001.

35. DESAI, M., THRELFALL, E.J., STANLEY, J. Fluorescent amplified length polymorphism subtyping of the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage type 4 clone complex. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.1, p.201-206, 2001.

36. GUERRA B, LACONCHA I, SOTO SM, GONZÁLEZ-HEVIA A, MENDOZA MC. Molecular characterisation of emergent multiresistant *Salmonella enterica* serotype [4,5,12:i:-] organisms causing human salmonellosis. *FEMS Microbiology Letters* 2000; 190: 341-7.

37. BOONMAR, S.; BANGTRAKULNONTH, A.; PORNRUNANGWONG, S.; TERAJIMA, J.; WATANABE, H.; KANEKO, K.-I.; OGAWA, M. Epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* isolates from humans and broiler chickens in Thailand by phage typing and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v.36, n.4, p.971-974, 1998.

38. TSEN, H.Y.; LIN, J.S. Analysis of *Salmonella* Enteritidis Strains Isolated from Food-poisoning Cases in Taiwan by Pulsed Field Gel Electrophoresis, Plasmide Profile and Phage Typing. *Journal of Applied Microbiology*, v.91, p.72-79, 2001.

39. SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C.R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell*, Cambridge, v.37, p.67-75, 1984.

40. GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* 0157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. *Journal of Clinical Microbiology* 35:2977-2980. 1997.

41. TOZETTO, S.M. Sorotipos e Tipagem Molecular de Isolados de *Salmonella enterica* NO no Paraná no período de outubro de 2002 a maio de 2004. Paraná, 2006. 83p. Dissertação [Mestrado em Ciência Farmacêuticas] - Universidade Federal do Paraná, PR.

42. TENOVER, F. C., R. D. ARBEIT, R. V. GOERING, P. A. MICKELSEN, B. E. MURRAY, D. H. PERSING, B. SWAMINATHAN. 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33:2233-2239.

43. LAPUZ, R.; TANI, H.; SASAI, K.; SHIROTA, K.; KATOH, H.; BABA, E. An epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis contamination in a rat-infested *Biosaúde*, Londrina, v. 13, n. 1 / 2, 2011

chicken layer farm, an egg processing facility, and liquid egg samples by pulsed-field gel electrophoresis. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v69, n.6, p.649-652, 2007.

44. GARAIZAR, J.; LÓPEZ-MOLINA, N.; LACONCHA, I.; BAGGESEN, D.L.; REMENTERIA, A.; VIVANCO, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I. Suitability of PCR fingerprinting, infrequent-restriction-site PCR, and pulsed-field gel electrophoresis, combined with computerized gel analysis, in library typing of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.66, n.12, p.5273-5281, 2000.

45. POWELL NG, THRELFALL EJ, CHART H, ROWE B. Subdivision of *Salmonella enteritidis* PT 4 by pulsed-field gel electrophoresis: potential for epidemiological surveillance. *FEMS Microbiology Letters* Jun 1;119(1-2):193-8

46. NAUERBY, B.; PEDERSEN, K.; DIETZ, H.H.; MADSEN, M. Comparison of Danish Isolates of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT9a and PT11 from hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) and humans by plasmid profiling and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, v.38, n.10, p.3631-3635, 2000.

47. PETERS T. M., C. MAGUIRE, E. J. THRELFALL, I. S. T. FISHER, N. GILL, A. J. GATTO. The Salm-gene project – a European collaboration for DNA fingerprinting for food-related salmonellosis. *Eurosurveillance* 8:46- 50.2003.

48. FISHER IST on behalf of the Enter-net participants. International trends in *Salmonella* serotypes 1998-2003 – A surveillance report from the Enter-Net International Surveillance Network. (www.hpa.org.uk/enter-net) *Eurosurveill* 2004; 9(4): 45-7.

49. SWAMINATHAN, B.; BARRETT, T.J.; HUNTER, S.B.; TAUXE, R.V.; CDC PULSENET TASK FORCE. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v.7, n.3, p.382-389, 2001.

50. STANLEY, J.; CLIVE, S.J.; THRELFALL, E.J. Evolutionary lines among *Salmonella enteritidis* phage types are identified by insertion sequence IS200 distribution. *FEMS Microbiology Letters*, n.82, p.83-90, 1991.

51. LIEBANA E.; GARCIA-MIGURA L.; CLOUTING C.; CLIFTON-HADLEY F. A.; BRESLIN M.; DAVIES R. H; Molecular fingerprinting evidence of the contribution of wildlife vectors in the maintenance of *Salmonella* Enteritidis infection in layer farms. *Journal of Applied Microbiology*, n.94, p.1024-1029, 2003.

52. CARDINALE, E.; GROS-CLAUDE, J.D.P., RIVOAL, K., ROSE, V., TALL,F., MEAD, G.C., SALVAT, G. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *Enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from Humans and broiler chickens in Senegal using pulse-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *Journal of Applied Microbiology*. V. 99, p.968-977, 2005.

53. FERNANDEZ, J. FICA, A., EBENSPERGER G., CALFULLAN, H., PRAT, S., FERNANDEZ, A., ALEXANDRE M., HEITMANN, I. Analysis of molecular epidemiology of Chilean *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates by pulsed-field gel electrophoresis and bacteriophage typing. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.4, p.1617-1622, 2003.