



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos (PPGCTA)



**Roberta Capalonga**  
(Nutricionista – UFRGS)

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DAS  
SALMONELLA ENTERITIDIS ENVOLVIDAS EM SURTOS ALIMENTARES NO  
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL NO PERÍODO DE 2007 A 2013**

Porto Alegre,  
2014.

#### CIP - Catalogação na Publicação

Capalonga, Roberta

ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E  
GENOTÍPICAS DAS SALMONELLA ENTERITIDIS ENVOLVIDAS EM  
SURTOS ALIMENTARES NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL NO  
PERÍODO DE 2007 A 2013 / Roberta Capalonga. -- 2014.  
67 f.

Orientador: Eduardo Cesar Tondo.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia  
de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Salmonella. 2. surtos alimentares. 3. PCR-  
Ribotipificação. 4. Rio Grande do Sul. I. Tondo,  
Eduardo Cesar, orient. II. Título.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

**Roberta Capalonga**  
(Nutricionista – UFRGS)

**ESTUDO DAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS E GENOTÍPICAS DAS  
SALMONELLA ENTERITIDIS ENVOLVIDAS EM SURTOS ALIMENTARES NO  
ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL NO PERÍODO DE 2007 A 2013**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Cesar Tondo

Porto Alegre,  
2014.

**Roberta Capalonga**  
(Nutricionista – UFRGS)

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

**MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em:  
Pela Banca Examinadora:

Homologada em:  
Por:

---

EDUARDO CESAR TONDO  
Orientador – PPGCTA/UFRGS

---

MARCO ANTÔNIO ZACHIA AYUB  
Coordenador – Programa de Pós-  
Graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos (PPGCTA/UFRGS)

---

ANA BEATRIZ A. DE OLIVEIRA  
Banca – NUTRIÇÃO/UFRGS

---

ADRIANO BRANDELLI  
Banca – PPGCTA/UFRGS

---

PATRICIA DA SILVA MALHEIROS  
Banca – ICTA/UFRGS

---

VITOR MANFROI  
Diretor – Instituto de Ciência e  
Tecnologia de Alimentos (ICTA/UFRGS)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Professor Eduardo Cesar Tondo pela oportunidade, confiança e contribuição na minha formação, e por me instigar na incessante busca pelo conhecimento.

À minha família, pelo carinho, apoio e estímulo, e por serem para mim exemplos, aos quais seguirei por toda minha vida. Em especial, à Flávia, por me acompanhar em boa parte desse trabalho e à minha mãe, meu amor maior.

Ao meu namorado, pelo amor, carinho, apoio e compreensão, principalmente nos momentos em que não pude estar ao seu lado.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pelo aprendizado e ajuda na realização deste trabalho. Em especial, à Cheila Daniel de Paula, por me passar confiança e conhecimento.

Ao Laboratório Central do Estado (FEPPS/IPB/LACEN/RS), em especial “gurias”: Rosane, Jane, Mara, Solange e Simone, pela recepção sempre calorosa e disponibilidade.

Às minhas colegas do Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição do Escolar (CECANE UFRGS), pela parceria, compreensão e apoio. Principalmente à Ana B, pelo entusiasmo, credibilidade e carinho.

Aos meus amigos, pelo incentivo e amizade, sempre me dando força e coragem para esta conquista.

A todos que de uma forma ou de outra contribuíram para meu aprendizado e formação e me auxiliaram durante a elaboração deste.

## RESUMO

*Salmonella* é uma das principais causas de Doenças Transmitidas por Alimentos em todo o mundo, sendo que no Estado do Rio Grande do Sul (RS) esse microrganismo tem sido apontado como um dos principais agentes de toxinfecções alimentares nos últimos anos. Neste trabalho foram caracterizados isolados de *Salmonella* envolvidas em salmoneloses ocorridas no RS, no período de 2007 a 2013. Entre os 163 isolados investigados, 138 (84,7%) foram sorotipificados com *S. Enteritidis*, enquanto os outros isolados foram *S. Schwarzengrund* (n = 9 – 5,5 %), *S. Typhimurium* (n = 6 – 3,7%), *S. Infantis* (n = 1 – 0,6 %), *S. Agona* (n = 1 – 0,6 %), *S. Derby* (n = 1 – 0,6 %), *S. London* (n = 1 – 0,6 %), *S. Give* (n = 1 – 0,6 %), *S. Panama* (n = 1 – 0,6 %) e *S. enterica* (n = 4 – 2,5 %). Os principais alimentos envolvidos nos surtos foram maionese caseira (17,39%), seguido dos produtos de confeitaria (15,94 %) e carnes (12,32 %). A resistência da *S. Enteritidis* a 12 agentes antimicrobianos também foi investigada. As maiores porcentagens de resistência foram encontradas em relação à nitrofurantoína (94,2 %) e ao ácido nalidíxico (89,1 %). A resistência para duas drogas foi verificada em 80,43 % dos isolados. Sendo que a multirresistência para três ou cinco antimicrobianos foi verificada em quatro e dois isolados, respectivamente. Quando os isolados foram submetidos à PCR-Ribotipificação, apenas um perfil de bandas foi identificado. Os resultados de PCR-Ribotipificação sugerem que uma mesma cepa de *S. Enteritidis* foi isolada a partir de alimentos envolvidos em salmoneloses ocorridas em diferentes municípios do Estado do RS no período de 2007 a 2013. Uma vez que o mesmo perfil de bandas foi identificado em *S. Enteritidis* causadoras de salmoneloses, durante 1999 a 2006, os resultados indicam que a mesma cepa de *S. Enteritidis* tem causado surtos alimentares no RS, durante o período de 1999 a 2013.

**Palavras-chaves:** *Salmonella*, surtos alimentares, resistência, PCR-ribotipificação, sul do Brasil.

## ABSTRACT

*Salmonella* is a major cause of Foodborne Diseases worldwide, and in the State of Rio Grande do Sul (RS) this microorganism has been identified as the main agent of foodborne diseases in last years. In this work, *Salmonella* isolates responsible for salmonellosis occurred in the State of RS, in the period 2007 to 2013 were characterized. Among the 163 isolates investigated, 138 (84.7 %) were serotyped as *S. Enteritidis*, whereas the other isolates were *S. Schwarzengrund* (n = 9 – 5.5 %), *S. Typhimurium* (n = 6 – 3.7 %), *S. Infantis* (n = 1 – 0.6 %), *S. Agona* (n = 1 – 0.6 %), *S. Derby* (n = 1 – 0.6%), *S. London* (n = 1 – 0.6 %), *S. Give* (n = 1 – 0.6 %), *S. Panama* (n = 1 – 0.6 %) and *S. enterica* (n = 4 – 2.5 %). The main food vehicles identified were homemade mayonnaise (17.39 %), followed by pastry products (15.94 %) and beef (12.32 %). The *S. Enteritidis* resistance to 12 antimicrobial agents was investigated. The highest percentages of resistance were found to nitrofurantoin (94.2 %) and nalidixic acid (89.1 %). The resistance to two different drugs was observed in 80.43 % of the isolates. Multidrug-resistance for three to five antimicrobials was observed in four and two isolates, respectively. When the isolates were analysed by PCR-Ribotyping, only one banding profile was identified. The results of PCR-Ribotyping suggest that the same strain of *S. Enteritidis* was isolated from foods involved in salmonellosis occurred in different municipalities of the State of RS in the period 2007-2013. Since the same banding pattern was found in strains involved in salmonellosis outbreaks of 1999 to 2006, results indicated that the same strain of *S. Enteritidis* has caused salmonellosis outbreaks in RS, during the period of 1999 to 2013.

**Keywords:** *Salmonella*, salmonellosis outbreaks, resistance, PCR-Ribotyping, Southern Brazil.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Increase in the percentage of resistance to nalidixic acid (NAL) of *S. Enteritidis* isolated from foods involved in outbreaks in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, from 1999 to 2012. Source: Geimba et al. (2005); Oliveira et al. (2006); De Paula et al. (2011) and present results from this study ..... 36
- Figura 2** – PCR-Ribotyping profile of *S. Enteritidis* isolated from foods involved in salmonellosis outbreaks in Southern, Brazil, during the years 2007 and 2013 ..... 48



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – <i>Salmonella</i> serovars involved in foodborne outbreaks in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2012 .....	32
<b>Tabela 2</b> – Foods involved in salmonellosis outbreaks caused by <i>S. Enteritidis</i> in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2012 .....	33
<b>Tabela 3</b> – Antimicrobial results of <i>S. Enteritidis</i> involved in foodborne salmonellosis occurred in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2012 .....	34
<b>Tabela 4</b> – Antimicrobial resistance profiles of <i>S. Enteritidis</i> involved in salmonellosis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2012 .....	35

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	<b>4</b>
1.1.1 OBJETIVO GERAL .....	4
1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	4
<b>1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
1.2.1 SALMONELLA – CARACTERÍSTICAS GERAIS .....	5
1.2.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E SOROLÓGICAS .....	6
1.2.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA .....	7
1.2.4 SALMONELOSES .....	7
1.2.5 CONTROLE DAS SALMONELOSES .....	10
1.2.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE MICRORGANISMOS .....	11
1.2.6.1 <i>Caracterização por PCR – Ribotipificação</i> .....	12
1.2.7 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS .....	13
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>15</b>
<b>2. RESULTADOS</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>49</b>
<b>3. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>50</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

*Salmonella* é um dos principais microrganismos causadores de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), em diversos países (HUGHES et al., 2007; GREIG & RAVEL, 2009; OLIVEIRA et al., 2010a), sendo responsável por inúmeros problemas de saúde pública e significativas perdas econômicas. No Brasil, esse microrganismo tem sido o principal causador de DTA nos últimos anos e, no Estado do Rio Grande do Sul (RS), a Divisão de Vigilância Sanitária (DVS/SES/RS) também tem apontado a *Salmonella* como o agente etiológico responsável pelo maior número de surtos alimentares na última década (TONDO & RITTER, 2012). No período de 1999 a 2006, as *Salmonella* foram responsáveis por muitos surtos alimentares no RS (OLIVEIRA et al., 2006; MALHEIROS et al., 2007; WELKER et al., 2010; DE PAULA et al., 2011), sendo que o sorovar *S. Enteritidis* causou mais de 90% dos surtos. Um fato interessante é que o maior número de surtos ocorreu na primavera e não no verão e os alimentos mais comumente envolvidos foram aqueles preparados a base de ovos, principalmente a maionese caseira (TONDO & RITTER, 2012).

Estudos indicam que um único clone de *S. Enteritidis* ou cepas intimamente relacionadas deste microrganismo estiveram envolvidas em surtos alimentares ocorridos no RS, entre 1999 e 2006, uma vez que as cepas isoladas apresentaram semelhantes perfis quando analisadas por PFGE (Eletroforese do Campo Pulsado), sequenciamento e PCR–Ribotipificação (MÜRMAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010b).

Segundo pesquisas anteriores, a resistência aos antimicrobianos das cepas de *S. Enteritidis* causadoras de surtos no RS tem aumentado significativamente. Diferentes antimicrobianos têm sido analisados e os resultados demonstram o aumento da resistência à ampicilina e, principalmente, ao ácido nalidíxico (OLIVEIRA et al., 2010b; DE PAULA et al., 2011).

Dentro deste contexto, a caracterização sistemática ao longo dos anos das cepas de *Salmonella* envolvidas em surtos alimentares do RS assume um papel de grande importância, uma vez que permite o maior conhecimento das características desses microrganismos, possibilitando estabelecer estratégias de prevenção.

Como forma de colaboração científica e de promoção da saúde pública, o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos do ICTA/UFRGS, a Divisão de Alimentos da Vigilância Sanitária Estadual (CEVS) e o Laboratório Central do RS (FEPPS/IPB/LACEN/RS) vêm estudando os surtos de salmonelose ocorridos no Estado desde 1997 até 2006 (CONSTALUNGA & TONDO, 2002; SILVEIRA & TONDO, 2006; DE PAULA et al., 2011). No intuito de dar continuidade ao estudo desse importante patógeno, o presente trabalho tem por objetivo caracterizar cepas de *Salmonella* envolvidas em surtos alimentares ocorridos no RS, entre os anos de 2007 a 2013.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 OBJETIVO GERAL**

- Caracterizar os isolados de *Salmonella* envolvidos em surtos alimentares ocorridos no Estado do Rio Grande do Sul, entre os anos de 2007 a 2013.

### **1.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar e compilar os dados dos formulários de investigação e análise de isolados de *Salmonella* originados pela FEPPS/IPB/LACEN/RS;

- Analisar os principais sorovares de *Salmonella* envolvidos nos surtos, a resistência a antimicrobianos e os principais alimentos envolvidos nos surtos;

- Caracterizar por PCR-Ribotipificação os isolados do principal sorovar de *Salmonella* identificado pelas análises da FEPPS/IPB/LACEN/RS.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 *SALMONELLA* – CARACTERÍSTICAS GERAIS

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*; são pequenos bastonetes Gram negativos, não produzem esporos, anaeróbios facultativos, não fermentadores da lactose, amplamente distribuídos na natureza (FRANCO & LANDGRAF, 2004; JAY, 2005).

*Salmonella* são consideradas potencialmente patogênicas, sendo o grau de virulência dependente da própria linhagem, do hospedeiro e do meio ambiente. Têm o homem ou os animais como principais reservatórios (JAY, 2005; FORSYTHE, 2013).

O pH ótimo para a sua multiplicação encontra-se próximo de neutralidade, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores a 4,0 são considerados bactericidas (JAY, 2005; FORSYTHE, 2013). Colônias típicas desse microrganismo são capazes de se formar em 24 hs a 37°C (JAY, 2005).

Outro fator que afeta sua multiplicação é a atividade de água ( $a_w$ ). Em relação a isso, a inibição do crescimento é observada em valores menores que 0,94 em meios com pH neutro, e as *Salmonella* podem sobreviver por até mais de um ano em alimentos com baixa  $a_w$ , sendo o valor ótimo para o crescimento é de 0,95 (JAY, 2005; GERMANO & GERMANO, 2008; FORSYTHE, 2013).

### 1.2.2 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E SOROLÓGICAS

Após o isolamento a partir de amostras biológicas, aconselha-se a caracterização bioquímica e sorológica das *Salmonella* a fim de identificá-las com maior precisão. Tais procedimentos são muito importantes em vista da necessidade de confirmação da presença desse microrganismo em determinada amostra, evitando resultado falso positivo ocasionado em virtude de outros microrganismos presentes. As principais características bioquímicas da *Salmonella* são: a capacidade de reduzir nitratos a nitritos, a produção de gás a partir da glicose, a utilização do citrato como fonte de carbono, a fermentação de dulcitol e inositol, a produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S) em meios como o TSI, o LIA e o SIM e reações de descarboxilação de lisina, ornitina e arginina, usualmente positivas. Não apresenta também, atividade de hidrólise da ureia e não fermenta lactose, sacarose, salicina e rafinose (POPOFF & LE MINOR, 1997; POPOFF et al., 2003).

A tipificação sorológica é realizada após a classificação bioquímica das *Salmonella*. Em virtude da grande variedade de sorovares de *Salmonella* identificados, a caracterização sorológica desses microrganismos assume papel muito importante na investigação epidemiológica de surtos de salmoneloses alimentares. Atualmente, sabe-se que parcelas significativas de surtos são causados por sorovares específicos, principalmente por representantes de *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*) e *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*) (JAY, 2005; DE PAULA et al., 2011).



### 1.2.3 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA

A taxonomia do gênero *Salmonella* é baseada na composição de seus antígenos de superfície, os quais são antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi). Este esquema de classificação proposto por Kauffmann (1972) divide o gênero *Salmonella* em sorovares. No caso, o gênero *Salmonella* estaria dividido em duas espécies (*S. enterica* e *S. bongori*) e em mais de 2.600 sorovares (GRIMONT & WEILL, 2007; JAY, 2005; FORSYTHE, 2013).

A subespécie *enterica* agrupa as salmonelas associadas às infecções (principalmente gastroenterites) em humanos e animais de sangue quente, enquanto as demais subespécies e *S. bongori* são encontradas em animais de sangue frio e no meio ambiente (SANT'ANA et al., 2008; FORSYTHE, 2013).

Além da fórmula antigênica, a maior parte dos sorovares são denominados conforme a síndrome relacionada (Typhi, Paratyphi, etc.), hospedeiro específico (Abortusovis, Abortusequi, Cholerasuis, entre outros) ou origem geográfica dos primeiros isolamentos (London, Panamá, Canadá, etc.). Apesar da variedade, menos de 50 sorovares são realmente prevalentes e frequentemente isolados infecções em humanos e animais (JAY, 2005).

### 1.2.4 SALMONELOSES

As doenças causadas por *Salmonella* spp. são conhecidas como salmoneloses e podem ser divididas em três grupos: a febre tifóide, causada por *Salmonella* Typhi (*S. Typhi*), as febres entéricas, causadas por *Salmonella* Paratyphi

(A, B e C) e as enterocolites, causadas pelas demais *Salmonella* (JAY, 2005; FORSYHTE, 2013).

A febre tifóide só acomete o homem e, normalmente, é transmitida por alimentos ou água contaminada com material fecal humano. O reservatório de *S. Typhi* é o homem e, em casos onde algumas pessoas podem se tornar portadores assintomáticos, estes são considerados a principal fonte de contaminação de alimentos e águas. A febre entérica é muito semelhante à febre tifóide, porém apresenta sintomas mais brandos, os quais podem persistir por até três semanas, ao contrário da febre tifóide que pode persistir por até nove semanas (FORSYTHE, 2013).

Os sintomas da febre tifóide são causados pelo lipopolissacarídeo (LPS), que induz uma resposta inflamatória local durante a invasão da mucosa (FORSYTHE, 2013). Ao contrário da *S. Typhi*, não se sabe ao certo se as linhagens que causam doenças de origem alimentar (*S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*) estão no interior dos macrófagos do fígado e do baço. Os sintomas das gastroenterites resultam, provavelmente, da invasão das células da mucosa. *S. Typhi* causa uma infecção sistêmica, enquanto patógenos entéricos tais como *S. Typhimurium* raramente penetram além dos tecidos submucosos (JAY, 2005).

A doença mais comumente causada por *Salmonella* spp., a enterocolite resultante também da ingestão de alimentos ou água contaminada, é uma das mais frequentes infecções de origem alimentar no mundo inteiro (FORSYTHE, 2013).

Apesar da enterocolite ser a mais branda das manifestações causadas por *Salmonella* spp., a alta frequência dos casos é responsável por milhares de mortes

todo ano. Somente nos Estados Unidos (EUA), estima-se que 800 a 4000 mortes ocorram devido à salmonelose (FORSYTHE, 2013). Os sintomas mais comumente associados às enterocolites são as diarreias sanguinolentas, vômitos, febre, dores abdominais e desidratação, podendo resultar em morte (JAY, 2005; FORSYTHE, 2013; TONDO & BARTZ, 2014).

Tais enfermidades têm sido responsáveis por grandes problemas de saúde pública e prejuízos econômicos decorrentes de tratamento dos casos clínicos, do recolhimento de lotes de alimentos contaminados ou do impacto sobre a confiabilidade dos consumidores frente aos produtos de marcas envolvidas com surtos de salmonelose (HUGHES et al., 2007; GREIG & RAVEL, 2009; OLIVEIRA et al., 2010a).

No RS, as salmoneloses foram responsáveis por inúmeros casos de hospitalizações entre os anos de 1997 a 2004, atingindo um elevado número de pessoas envolvidas. O maior número de salmonelose ocorreu na primavera, e este fato pode ser explicado por refrigeração inadequada dos alimentos durante esta temporada apresentando temperaturas amenas. As faixas etárias mais afetadas foram aquelas entre 16 e 50 anos, e o alimento mais comum foi salada de batata feita com maionese caseira preparada com ovos crus. O segundo alimento envolvido foi o grupo das carnes e derivados. A maioria dos surtos de salmonelose no RS, ocorreu nas residências, e em segundo lugar estão os serviços de alimentação. A incidência entre homens e mulheres foi praticamente a mesma durante o período de 1997 a 2004 (TONDO & RITTER, 2012).

### 1.2.5 CONTROLE DAS SALMONELOSES

O controle de infecções por *Salmonella* spp. deve ser feito através de padrões de higiene aplicados nos setores de alimentação, além da utilização de recursos durante o processamento dos alimentos, como por exemplo, a utilização de tratamentos térmicos, técnicas de exclusão competitiva, utilização de ácidos orgânicos, entre outros (JAY, 2005).

Órgãos relacionados à saúde pública, assim como laboratórios prestadores de serviços contribuem para a prevenção de salmoneloses, buscando identificar as possíveis falhas ocorridas desde a produção até o consumo dos alimentos (WELKER et al., 2010). Entretanto, os métodos tradicionalmente utilizados muitas vezes não são capazes de realizar tal tarefa devido aos limites de detecção (sensibilidade) ou capacidade de discriminação entre *Salmonella* spp. e outros microrganismos ou mesmo entre diferentes linhagens desta mesma bactéria.

Além disso, o sistema de saúde pública necessita de métodos que auxiliem na identificação das fontes de contaminação de microrganismos patogênicos, além de estudos de incidência, nível endêmico, prevalência e evolução de surtos que venham acometer uma determinada localidade.

Para o sucesso destes objetivos, é necessário a utilização de técnicas que tenham a capacidade de discriminar linhagens relacionadas ou não relacionadas epidemiologicamente, ou seja, correlacionar microrganismos isolados de locais e fontes distintas. Dentre as técnicas aplicadas na investigação de surtos alimentares causados por *Salmonella* spp., os métodos moleculares têm demonstrado muito

bons resultados, devido seu alto poder de discriminação (LANDERAS & MENDOZA, 1998).

### **1.2.6 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE MICRORGANISMOS**

De modo geral, o envolvimento de linhagens específicas nos surtos de salmonelose indica que essas linhagens apresentam características diferenciadas capazes de possibilitar sua disseminação entre determinadas populações. Com este enfoque, fica clara a necessidade de realizar estudos referentes à epidemiologia molecular e patogênese destas *Salmonella* (CASTELANI & DUARTE, 2011).

Dentre os surtos causados por *S. Enteritidis*, diversos estudos moleculares sugerem que um número limitado de linhagens com características genéticas semelhantes vêm causando surtos em humanos (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010b).

A necessidade de aplicação de métodos mais sensíveis na caracterização de *Salmonella* tem levado à utilização cada vez mais frequente de técnicas moleculares (CASTELANI & DUARTE, 2011).

Entre os métodos moleculares mais utilizados para a caracterização genotípica de microrganismos patogênicos estão: a ribotipificação, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*), a PCR em tempo real (*Real Time PCR*), a PCR ribotipificação (*PCR Ribotyping*) e a multiplex PCR (mPCR) (GÜRTLER & MAYALL, 2001). Além destes, outro método utilizado é a eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), que foi por muito tempo considerado padrão ouro para a caracterização de muitas bactérias, entre as quais *Salmonella* spp. (OLIVEIRA et al.,

2010b). Ele tem a vantagem de ser universal, porém em oposição, pode ser considerado relativamente caro e elaborado, pois exige conhecimentos e equipamentos especializados (JAY, 2005).

O desenvolvimento das técnicas de biologia molecular apresentam algumas vantagens sobre os métodos convencionais, como o maior poder de discriminação e melhor reprodutibilidade (CASTELANI & DUARTE, 2011). Da mesma forma, as técnicas tradicionais baseiam-se em características morfológicas e bioquímicas para a tipificação e identificação de gêneros, espécies e subespécies de microrganismos que incluem padrões de resistência aos antibióticos, reações bioquímicas e sorológicas e muitas vezes são ineficientes e morosas (CASTELANI & DUARTE, 2011).

A aplicação de métodos moleculares permite, na maioria das vezes, a identificação correta da espécie e a diminuição do tempo necessário para a caracterização morfológica dos microrganismos, além da investigação de surtos e suas correlações (GANDRA et al., 2008).

#### **1.2.6.1 Caracterização por PCR–Ribotipificação**

A PCR–Ribotipificação é considerada uma substituta da ribotipificação clássica e tem sido amplamente utilizada em biologia molecular, devido a sua rapidez e eficácia (FREITAS et al., 2009). Essa técnica utiliza sequências iniciadoras que anelam nas regiões 16S e 23S e amplificam sequências presentes entre os genes do *operon* ribossomal. As regiões espaçadoras entre as regiões 16S e 23S apresentam variações que podem ser utilizadas para caracterizar os microrganismos

em nível de gênero, espécie e subespécie (FARBER et al., 2001; CASTELANI & DUARTE, 2011).

No Brasil, Geimba et al. (2004) consideraram a técnica de PCR–Ribotipificação bastante reprodutível e apropriada para a tipificação de *Salmonella* envolvidas em surtos alimentares no RS. Em 2005, Oliveira et al. também destacaram a adequação e a boa reprodutibilidade da PCR–Ribotipificação na caracterização molecular de *Salmonella* isoladas de alimentos envolvidos em surtos e além disso, destacou o custo relativamente baixo de execução dessa técnica.

### **1.2.7 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

*Salmonella* não é só um problema de saúde pública, devido ao número de casos de salmonelose que causa, mas também porque muitas estirpes são resistentes a um número de agentes antimicrobianos. A resistência aos antibióticos vem aumentando rapidamente em todo o mundo, e o uso indiscriminado e incorreto de antibióticos tem facilitado o surgimento de resistência em muitos sorovares. (TONDO & RITTER, 2012). Embora a resistência aos antibióticos em *S. Enteritidis* tem sido considerada baixa quando comparada com o aumento dramático da resistência demonstrada por alguns isolados de *S. Typhimurium* (YANG et al., 2002), deve ser dada atenção ao isolamento frequente desse agente. A vigilância da resistência antimicrobiana crescente de *S. Enteritidis* é especialmente importante, uma vez que este sorotipo passou a ser o agente predominante de salmonelose humana em muitos países nos últimos anos, incluindo o Brasil. Durante a última

década no Estado RS, a resistência de *S. Enteritidis* isoladas de DTA tem sido objeto de estudos (TONDO & RITTER, 2012).

Múltiplas drogas têm sido analisadas e os resultados dos isolados de *S. Enteritidis* no RS demonstram o aumento da resistência à ampicilina e, principalmente, ao ácido nalidíxico (OLIVEIRA et al., 2010b; DE PAULA et al., 2011). Entre os anos de 1999 a 2006, pode ser observado que os isolados apresentaram o mesmo comportamento para o ácido nalidíxico (GEIMBA et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2006; DE PAULA et al., 2011).

A resistência elevada para ácido nalidíxico e a resistência para ciprofloxacina são questões de preocupação, pois vários estudos relataram aumento do número de cepas de *Salmonella* sp. resistente às quinolonas na Alemanha (MALORNY et al., 1999), Inglaterra e País de Gales (THRELFALL et al., 2006) e Espanha (MARIMON et al., 2004). Destacando essa preocupação o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) elaborou uma orientação recomendando laboratórios clínicos para testar rotineiramente a resistência ao ácido nalidíxico em *Salmonella* extraintestinal isoladas, a fim de alertar sobre a resistência emergente (NCCLS, 2005). As quinolonas são amplamente utilizadas na produção de alimentos de origem animal e ao mesmo tempo são disponibilizadas como métodos terapêuticos para as infecções por *Salmonella*, em adultos (TONDO & RITTER, 2012).

Os resultados do mapeamento da susceptibilidade aos antimicrobianos são importantes para caracterização do perfil de resistência e para a monitorização contínua das características dos principais agentes causadores de surtos de origem alimentar no Estado do RS (DE PAULA et al., 2011).



## **CAPÍTULO 2**

## 2. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo estão apresentados na forma de artigo científico.

O subtítulo 2.1 corresponde ao artigo formatado de acordo com as orientações da *The Journal of Infection in Developing Countries* (JIDC), revista a qual foi aceito para publicação e o subtítulo 2.2 ao segundo artigo conforme normas de submissão da *Journal of Food Safety*.

### **2.1 Artigo 1 – *Salmonella* serotypes, resistance patterns and food vehicles of salmonellosis occurred in southern Brazil, 2007 - 2012**

Artigo aceito para publicação em 04 de dezembro de 2013.

***Salmonella* serotypes, resistance patterns and food vehicles of salmonellosis occurred in southern Brazil, 2007 - 2012**

**Running title: *Salmonella* and salmonellosis in southern Brazil**

Roberta Capalonga<sup>1</sup>, Rosane Campanher Ramos<sup>2</sup>, Jane Mari Correa Both<sup>2</sup>, Mara Lúcia Tiba Soeiro<sup>2</sup>, Solange Mendes Longaray<sup>2</sup>, Simone Haas<sup>2</sup>, Eduardo Cesar Tondo<sup>1\*</sup>

1. Department of Food Sciences, Laboratory of Microbiology and Food Control, Federal University of Rio Grande do Sul, Institute of Food Science and Technology (ICTA/UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2. Foundation of Production and Health Research of Rio Grande do Sul, Central Laboratory of the State of Rio Grande do Sul (FEEPS/IPB-LACEN/RS), Division of Product Analyses (DAP), Section of Microbiology, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Corresponding author: Eduardo César Tondo – E-mail: [tondo@ufrgs.br](mailto:tondo@ufrgs.br) – (0055 51) 3308-6677.

## ABSTRACT

Introduction: Previous studies have identified *Salmonella* as the main causative agent of foodborne diseases in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil, during 1997 to 2006. This study aimed to describe the *Salmonella* serotypes, the antimicrobial patterns and food vehicles of salmonellosis occurred in RS from 2007 to 2012. Methodology: we analyzed information regarding *Salmonella* isolates and salmonellosis outbreaks registered on the official records of the Central Laboratory of RS (FEEPS/IPB-LACEN/RS). Results: Among the 163 isolates investigated, 138 (84.7 %) were identified as *S. Enteritidis*. The second and third most frequent serovars identified were *S. Schwarzengrund* (5.5 %) and *S. Typhimurium* (3.7 %). Homemade mayonnaise was the food vehicle most frequently registered (17.39 %), followed by pastry products (15.94 %) and beef (12.32 %). The antimicrobial resistance was analyzed testing 12 drugs, and the higher percentages of resistance were observed to nitrofurantoin (94.2 %) and nalidixic acid (89.1 %). The resistance to these two drugs was verified in 80.43 % of the isolates. Multi-resistance to three and five drugs was verified in four and two isolates, respectively. Conclusion: Comparing the results of the present study with results of previous reports, it was possible to conclude that *S. Enteritidis* and homemade mayonnaise still are the main serotype and food vehicle of salmonellosis of RS and the antimicrobial resistance has been increasing among *S. Enteritidis* responsible for foodborne outbreaks in Southern Brazil.

**Keywords:** Salmonellosis, *Salmonella* Enteritidis, antimicrobials, State of Rio Grande do Sul, Brazil.

## INTRODUCTION

*Salmonella* is one of the main causative agents of foodborne disease (FBD) worldwide, being responsible for serious health problems and significant economic losses [1-3]. In many countries, including in Brazil, foods of animal origin have been identified as the primary vehicles of human salmonellosis. In Brazil, meat, eggs and egg products are the foods most frequently involved with illnesses [4-6]. Although there are more than 2,400 *Salmonella* serovars identified worldwide [7], in the last decade, a specific strain of *S. Enteritidis* was identified as the primary cause of salmonellosis in the State of RS, the southernmost State of Brazil [8-11]. This strain was named *S. Enteritidis* SE86 and has been investigated by our group since 1997 in order to attend its effects on public health of RS [5,6,8,9,12,13]. Among the investigations, antimicrobial resistance testing of the *S. Enteritidis* isolates has been carried out since 1999 [11,14,15]. Even though the salmonellosis caused by *S. Enteritidis* SE86 usually is limited to gastrointestinal tract and the treatment does not involve antibiotics, the use of these drugs is recommended when salmonellosis affects immunocompromised patients or when the symptoms of salmonellosis are more severe such as the presence of blood in stools and fever. Thus, the monitoring of the *Salmonella* serovars involved in foodborne diseases and its antimicrobial resistance patterns assume great importance to the salmonellosis control and the maintenance of public health. This study aimed at investigating the main *Salmonella* serovars and its resistance patterns, as well as the food vehicles of salmonellosis occurred in the RS from 2007 to 2012.

## METHODOLOGY

### Source of data of *Salmonella* isolates

Data on *Salmonella* isolates and salmonellosis outbreaks investigated in the present study were taken from FEEPS/IPB-LACEN/RS. The official records, as well as the information on foodborne outbreaks from FEEPS/IPB-LACEN/RS, were analyzed and compiled by the technical staff of Laboratory of Microbiology and Food Control of Federal University of Rio Grande do Sul - ICTA/UFRGS. Records involved information about all the samples collected from investigated salmonelloses of RS, during the period of January 2007 to February 2012. The State of RS is one of the 27 Brazilian States and has a population of approximately 10.7 million people, distributed in 496 cities. Salmonellosis outbreaks were notified and investigated by regional coordinators of the Division of Health Surveillance (DVS/RS), which, when possible, conducted sampling of suspect foods and transported them to FEEPS/IPB-LACEN/RS. In the Laboratories of this institution, isolation and biochemical identification of *Salmonella* were carried out according to the methods described by *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* [16]. Isolates were serotyped at Laboratory of *Enterobacteriaceae* at National Reference Center for Intestinal Bacterial Infections, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, Brazil) following methods described by Kauffman (1972) [17]. Official reports containing information about pathogenic microorganisms and of the foodborne outbreaks were prepared by FIOCRUZ and remitted to FEEPS/IPB-LACEN/RS. These documents were analyzed and the information about 163 isolates of *Salmonella* were investigated in the present study.

### **Antimicrobial Susceptibility**

The antimicrobial susceptibility testing was performed at FIOCRUZ. The isolates were analyzed for susceptibility to 12 antimicrobials using the disc diffusion method, according to the guidelines of *Clinical Laboratory Standards Institute* [18]. The antimicrobial

agents tested were ampicillin (AMP), chloramphenicol (CHL), tetracycline (TCY), cefoxitin (FOX), ceftazidime (CAZ), streptomycin (STR), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (GEN), imipenem (IMP), nalidixic acid (NAL), trimethoprim/sulfamethoxazole (STX) and nitrofurantoin (NIT). The resistance profile was determined according to the standards used by Laboratory of *Enterobacteriaceae* at FIOCRUZ.

## RESULTS

Among the 163 isolates analyzed, 138 (84.7 %) were identified as *S. Enteritidis*, 9 (5.5 %) as *S. Schwarzengrund* and 6 (3.7 %) as *S. Typhimurium*. Other six serovars were identified, each one in only one food sample (Table 1).

As can be seen in Table 2, among the foods involved in salmonellosis caused by *S. Enteritidis* in the State of RS from 2007 to 2012, homemade mayonnaise was the most frequently identified food vehicle (17.39 %), followed by pastry products (15.94 %) and beef (12.32 %). *S. Enteritidis* was isolated in 9.42 % of processed meat, 6.52 % of chicken meat and 2.17 % of pork. The other serovars of *Salmonella* were isolated from the following foods: *S. Derby* (processed meat), *S. Infantis* (sandwich), *S. London* (processed meat), *S. Panama* (processed meat), *S. Give* (processed meat), *S. Typhimurium* (mayonnaise and processed meat), *S. Schwarzengrund* (rice, pasta, meats, mayonnaise and raw vegetables), *S. Agona* (processed meat), *S. enterica* (pastry products, meat and eggs) (data not shown).

### Antimicrobial Resistance

Antimicrobial resistance patterns were investigated only in *S. Enteritidis* isolates and the results are presented in Table 3. The highest resistance percentage was observed for NIT (94.2 %) and NAL (89.1%). Only two isolates were resistant to TCY, two to AMP and two to

FOX. Three isolates were resistant to CAZ, CIP and SXT, separately, while no isolate showed resistance to CHL, STR, IMP and GEN. Table 4 shows the *S. Enteritidis* isolates resistance profiles. Among them, 11.6 % were resistant to only one drug (NIT or NAL) and 80.43 % were resistant to two antibiotics (NAL and NIT). Only one isolate was resistant to NAL and TCY. Three isolates showed intermediate resistance to NIT and one to STR. One isolate was multi-resistant to NAL, NIT and SXT. Three isolates were multi-resistant to NAL, NIT and TCY. Two isolates demonstrated multi-resistance to NAL, NIT, AMP, FOX and CIP, while another isolate was multi-resistant to NAL, NIT, AMP, FOX and CAZ.

## **DISCUSSION**

According to the results demonstrated in the present study, *S. Enteritidis* was the predominant *Salmonella* serovar isolated from foods involved in salmonellosis of RS between 2007 and 2012. This result is similar to the results demonstrated by previous studies analyzing foods involved in salmonellosis outbreaks occurred in RS, for example: Geimba et al. [12] demonstrated that 97 % of foods involved in salmonellosis occurred from 1999 to 2000 in the State of RS presented *S. Enteritidis*. Likewise, Oliveira et al. [8] indicated that this serovar was found in 93 % of foods involved in salmonellosis occurred in RS from 2001 to 2002. De Paula et al. [11] demonstrated that 87 % of foods responsible for salmonellosis in RS, from 2003 to 2006, were identified as *S. Enteritidis*. Compiling all these results together demonstrates that *S. Enteritidis* has been the main serovar isolated from foods involved in foodborne salmonellosis in the State of RS from 1999 to 2012.

Isolates of *S. Enteritidis* were also identified as a major food pathogen in other States of Brazil such as Santa Catarina [19], Paraná [20,21], and São Paulo [22]. Recently, the same



serovar was also identified as the main causative agent of human salmonellosis in other countries like the United States (USA) [23] and China [24].

In the present study, homemade mayonnaise was identified as the food most frequently involved in foodborne salmonellosis in RS, from 2007 to 2012. Similar results were shown by Costalunga & Tondo [5] and Silveira & Tondo [6] during the investigations of salmonellosis occurred from 1997 to 1999 and from 2000 to 2001, in RS, respectively.

According to the *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) [25], egg was the food most involved in salmonellosis outbreaks in the United States in 2007. Eggs have been primarily responsible for salmonellosis elsewhere in the world [1,2,26]. According to the CDC [27] only one in ten thousand eggs are contaminated with *Salmonella* in the United States and it is possible that a similar proportion of contaminated eggs could be found in Brazil, considering the well controlled industrialized egg production in Brazil. However, eggs without inspection may have much higher percentages of *Salmonella* contamination. The use of uninspected raw eggs was identified as one of the main causative factors of salmonellosis in the last decade in RS [5,6,12,13], even though the use of raw eggs is not allowed by the current good manufacturing practices regulation of RS [28].

As shown in Table 2, the pastry products and beef were the second and third main food vehicles of *S. Enteritidis* in the State of RS. These results can be justified by the high handling of pastry products during its preparation, as well as the possible cross-contamination within food services that prepare beef meals. The fact that *S. Enteritidis* has been associated mainly with poultry meat [13] and according to the results of the present study, *S. Enteritidis* was found on roast and baked beef strongly suggest the occurrence of cross-contamination after heat processing of these preparations. The hypothesis that one of the main causative factors of salmonellosis of RS during 2007 to 2012 was the cross-contamination after thermal

processing is reinforced by the isolation of *S. Enteritidis* from foods like ham, mortadella, pasta with meat sauce and rice with meat.

The 138 strains of *S. Enteritidis* isolated from food involved in foodborne outbreaks were analyzed for susceptibility to antimicrobial agents (Table 3). The highest percentages of resistance were observed for NIT and NAL.

Antimicrobial resistance is increasing rapidly worldwide, and the indiscriminate use and misuse of antibiotics has facilitated the emergence of resistance in many *Salmonella* serovars [13]. Although antimicrobial resistance in *S. Enteritidis* has been considered low when compared with the dramatic resistance increase of some isolates of *S. Typhimurium* [29], attention should be paid to frequent isolation of *S. Enteritidis* resistant to one or more antibiotics. The increasing antimicrobial resistance surveillance of *S. Enteritidis* is especially important since this serovar became the predominant agent of human salmonellosis in many countries in recent years, including in Brazil. During the last decade in RS, the resistance of *S. Enteritidis* isolated from foodborne illnesses has been the subject of several studies [8,11,13-15]. Several drugs have been analyzed and the *S. Enteritidis* responsible for salmonellosis in RS showed an increased resistance to AMP and especially to NAL [3,11]. Between the years 1999 to 2006, *S. Enteritidis* isolates showed a gradual increase in the resistance to NAL [8,11,14]. If these results were put together with the results of the present study, one can observe a clear growing increase in the proportion of *S. Enteritidis* isolates resistant to NAL (Figure 1).

As an example, Geimba et al. [14] observed that in 1999 12.8 % of the *S. Enteritidis* isolates were resistant to NAL, and in 2000 this percentage rose to 14.7 %. Oliveira et al. [8] showed an increase in the resistance to the same antibiotic from 19.0 % to 24.3 % between 2001 and 2002. De Paula et al. [11] showed an increase from 40.7 % to 66.7 % from 2003 to

2006. As demonstrated in the present study, in 2007, 89.1 % of the isolates were resistant to nalidixic, increasing to 100 % in 2012.

Geimba et al. [14] analyzed isolates of *S. Enteritidis* involved in foodborne outbreaks in RS between 1999 and 2000 and found 94.6 % of isolates with sensitivity to kanamycin, 95.9 % to trimethoprim/sulfamethoxazole, 98.6 % to chloramphenicol and 97.3 % to sulphazotrim. However, Oliveira et al. [8] analyzed isolates of *S. Enteritidis* involved in salmonellosis outbreaks in RS from 2001 to 2002 and found the highest percentage of sensitivity to tetracycline (91.1 %) and chloramphenicol (98.7 %) These authors did not detect resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole or sulphazotrim. In 2005, Geimba et al. [14] reported that from 1999 to 2000 the highest intermediate resistance was to streptomycin (37 %), gentamicin (13.7 %) and nalidixic acid (13.7 %) among *S. Enteritidis* isolated from foods involved in salmonellosis of RS. Oliveira et al. [8] showed that kanamycin (29.1 %), neomycin (17.7 %) and streptomycin (13.9 %) had the greatest intermediate resistance in isolates of *S. Enteritidis* involved in foodborne outbreaks from 2001 to 2002. In the present study, however, the intermediate resistance was found at low levels to nitrofurantoin (2.2 %) and streptomycin (0.7 %).

In Denmark, a study from 1995 to 2000 examined 2,546 *S. Enteritidis* isolates. This study demonstrated that 82 isolates (3.2 %) were resistant to nalidixic acid [30]. Prior to Denmark study, in France from 1994 to 1997 Breuil et al. [31] found lower percentages of resistance to nalidixic acid (2 to 4%) in *S. Enteritidis* isolated from human and animal samples.

The indiscriminate use of antibiotics in poultry, especially quinolones, facilitated the spreading of positive lots for *S. Enteritidis* [32]. The resistance to quinolones by *S. Enteritidis* was motivated by the extensive use of quinolones and similar drugs in animal feed [32].

Several studies have reported that *Salmonella* mainly from poultry has emerged as particularly resistant to quinolones [31,33,34]. This increasing *Salmonella* antimicrobial resistance in different parts of the world may indicate a spread of resistant or multi-resistant epidemic strains [35] and it is an important fact because food from animal origin, especially eggs and meat products, are frequently involved in salmonellosis outbreaks. One must consider that Brazil is the largest exporter of chicken and beef meat in the world and many meat industries are located in the southern region of the country. So the evaluation of the resistance in *Salmonella* isolates is of great importance.

In conclusion, the results of the present study demonstrated that *S. Enteritidis* was the serovar most isolated from foods involved in salmonellosis in RS between 2007 and 2012. Thus, it can be concluded that this serovar was the major agent of foodborne illnesses in the State of RS in recent years. Also, it demonstrated an important increase in the resistance of *S. Enteritidis* isolates to acid nalidixic during the last decade. The results also have demonstrated that homemade mayonnaise was the main food vehicle of salmonellosis in RS. Therefore, continuous monitoring of main causative bacterial agents of foodborne diseases in RS is important, in order to investigate changes in these strains and to prevent new and future foodborne outbreaks.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank all the Sanitary Surveillance Officers and FEPPS/IPB/LACEN who have worked hard in order to improve the food safety of the State of Rio Grande do Sul. Special thanks to the Director of FEPPS/IPB/LACEN, Dra. Raquel Fiori de Souza, for her intense dedication to the Public Health of the State of Rio Grande do Sul and for her important contribution with this study.

**References:**

1. Hughes C, Gillespie IA, O'Brien SJ, The Breakdowns in Food Safety Group (2007) Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. *Food Control* 18: 766–772.
2. Greig JD, Ravel A (2009) Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution. *International Journal of Food Microbiology* 130: 77–87.
3. Oliveira FA, Pasqualotto AP, Da Silva WP, Tondo EC (2010) Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. *Food Research International* 2010.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS. Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos. 2010. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_dta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf). Accessed 12 August 2012.
5. Costalunga S, Tondo EC (2002) Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 a 1999. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 342–346.
6. Silveira JB, Tondo EC (2006) Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001. In: International Symposium *Salmonella* and salmonellosis. Epidemiology and Public Health. Saint Malo, France, Sessão 5, Editora: Pierre Colin e Geneviève Clément 521-522.
7. Heyndrickx M, Vandekerchove D, Herman L, Rollier I, Grijspeerdt K, De Zut L (2005) Recent changes in *Salmonella* nomenclature: the need for clarification. *Vet. J.* 170: 275-277.
8. Oliveira FA, Brandeli A, Tondo EC (2006) Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *The New Microbiologica* 29: 49-54.

9. Malheiros PS, De Paula CMD, Tondo EC (2007) Growth kinetics of *Salmonella* Enteritidis involved in outbreaks of foodborne illness in Rio Grande do Sul, southern Brazil: a comparison with other serovar strains. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27(4): 751-755.
10. Welker CAD, Both JMC, Longaray SM, Haas S, Soeiro MLT, Ramos RC (2010) Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Bioci.*, Porto Alegre 8(1): 44-48.
11. De Paula CMD, Ritter AC, Pieta L, Do Amaral PH, Tondo EC (2011) Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil from 2003 to 2006. *Journal of Microbiology and Antimicrobials* 3(9): 233-240.
12. Geimba MP, Tondo EC, de Oliveira FA, Canal CW, Brandelli A (2004) Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *Amsterdam. J. Food Prot.* 67(6): 1229-1233.
13. Tondo EC, Ritter AC (2012) “*Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade” - “*Salmonella: Classification, Genetics and disease Outbreaks*”, editado pela Nova Science Publishers, Inc, Nova York, USA. ISBN: 978-161-942-928-4.
14. Geimba MP, Tondo EC, Brandelli A (2005) Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Enteritidis Isolated from Foods Involved in Human Foodborne Outbreaks Occurred in the South of Brazil, 1999 – 2000. *J. Food Saf.* 25(3): 173-182.
15. Oliveira FA, Frazzon APG, Brandeli A, Tondo EC (2007) Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella enteritidis* involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. *J Infect Developing Countries* 1(2): 170-176.

16. APHA (American Public Health Association) (2001) Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 th Edition. Washington.
17. Kauffman F (1972) Kauffmann-White Schema. In: Serological diagnosis of *Salmonella* species. Copenhagen: Munksgaard, pp. 59-123.
18. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2010) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. M100-S20 30(1): Replace M100-S29, 29(3).
19. Koerich GMD, De Luca ANB, Philippi JMS, Da Rosa CMA Análise dos surtos de DTA causados por *Salmonella* sp em Santa Catarina, Brasil, de 2006 a 2008. D. Ciências da Saúde - 3. Saúde Coletiva - 4. Saúde Pública. 62ª Reunião Anual da SBPC. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/1078.htm>. Accessed 12 August 2012.
20. Alcocer I, De Oliveira KMP, Vidotto MC, Oliveira TCRM (2006) Discrimination of *Salmonella* serovars isolated from chicken meat by REP and ERIC-PCR and phagotyping of Enteritidis serovars. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 26(2): 414-420.
21. Kottwitz LBM, Back A, Leão JA, Alcocer I, Karan M, Oliveira TCRM (2008) Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 60 (2): 496-498.
22. Tavechio AT, Ghilardi ÂCR, Peresi JTM, Fuzihara TO, Yonamine EK, Jakabi M, Fernandes SA (2002) *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. J Food Prot 65(6): 1041-1044.
23. Cho S, Whittam TS, Boxrud DJ, Bartkus JM, Rankin SC, Wilkins MJ, Somsel P, Downes FP, Musser KA, Root TP, Warnick LD, Wiedmann M, Saeed AM (2010) Use of multiple-locus variable number tandem repeat analysis and phage typing for subtyping of

*Salmonella* Enteritidis from sporadic human cases in the United States. Journal of Applied Microbiology 108: 859-867.

24. He G-Z, Feng Y, Tian W-I, Qian N, Deng S-X, An C-W (2011) Populations of *Salmonella* Enteritidis in Orally Infected White Chinese Goose. Journal of Animal and Veterinary Advances 10(17): 2234-2239.

25. CDC - Centers for Disease Control and Prevention (2009) FoodNet 2007 Surveillance Report. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. Disponível em: [http://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2007\\_annual\\_report\\_508.pdf](http://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2007_annual_report_508.pdf) Accessed 12 August 2012.

26. Much P, Pichler J, Allerberger F (2007) Foodborne infectious outbreaks, Austria 2005. Wien Klin Wochenschr 119: 150-157.

27. CDC – Centers for Disease Control and Prevention (2004) *Salmonella* surveillance: Annual Summary, 2004, Georgia: US Department of Health and Human Services.

28. RIO GRANDE DO SUL (2009) Portaria SES/RS nº. 78, de 30 de janeiro de 2009. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para Cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde, Porto Alegre, RS. 1ª Edição, p. 35–40.

29. Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser TE, Yoo HS, Kim SH, Lee BK, Park YH (2002) Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. Veterinary Microbiology 86: 295-301.

30. Molbak K, Gerner-Smidt P, Wegener HC (2002) Increasing Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis. Emerging Infectious Diseases 8: 514-515.



31. Breuil J, Brisabois A, Casin I, Armand-Lefèvre L, Frémy S, Collatz E (2000) Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 46: 965-971.
32. Silva EN, Duarte A (2002) *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 2(4): 85-100.
33. Malorny B, Schoroeter A, Helmuth R (199) Incidence of quilonone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 2278-2282.
34. Hakanen A, Siitonen A, Kotilainen P, Huovinen P (1999) Increasing quinolone resistance in salmonella isolates of foreign origin in Finland. In: Program and Abstracts of the Thirty-Ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Francisco, CA, 1999. Abstract 7515, p.100. American Society for Microbiology, Washington, DC.
35. Cruchaga S, Echeita A, Aludea A, Garcia-Pena J, Frias N, Usera MA (2001) Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47: 315-321.

**Table 1.** *Salmonella* serovars involved in foodborne outbreaks in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2012.

<i>Salmonella</i> Serovars	Number of involved food samples	Percentage (%)
<i>S. Enteritidis</i>	138	84.7
<i>S. Schwarzengrund</i>	9	5.5
<i>S. Typhimurium</i>	6	3.7
<i>S. enterica</i>	4	2.5
<i>S. Infantis</i>	1	0.6
<i>S. Agona</i>	1	0.6
<i>S. Derby</i>	1	0.6
<i>S. London</i>	1	0.6
<i>S. Give</i>	1	0.6
<i>S. Panama</i>	1	0.6
<b>Total</b>	<b>163</b>	<b>100</b>

**Table 2.** Foods involved in salmonellosis outbreaks caused by *S. Enteritidis* in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2012.

<b>Involved Food</b>	<b>Number of positive Samples</b>	<b>Percentage (%)</b>
Homemade mayonnaise	24	17.39
Pastry products (pies, cakes, puddins, sweets, others).	22	15.94
Beef (cooked, roast, barbecue)	17	12.32
Processed meat (ham, sausage, mortadella, etc.)	13	9.42
Mixed food (pasta with sauce, rice with meat, etc).	11	7.97
Chicken meat (cooked, roasted)	9	6.52
Sandwiches (07 hamburgers and 01 stuffed fried bread dough)	8	5.80
Cheese	6	4.35
Raw egg	5	3.62
Rice	5	3.62
Boiled vegetables (02 potatoes, 02 canned mixed vegetables)	4	2.90
Pork meat (cooked, roasted)	3	2.17
Beans	2	1.45
Raw vegetables (01 lettuce, 01 tomato)	2	1.45
Raw capelletti	2	1.45
Fruit salad	1	0.72
Eggs threads	1	0.72
Cold chicken pie	1	0.72
Peas	1	0.72
Potato chips	1	0.72
<b>Total</b>	<b>138</b>	<b>100</b>

**Table 3.** Antimicrobial results of *S. Enteritidis* involved in foodborne salmonellosis occurred in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2012.

<b>Antimicrobials</b>	<b>Number of Resistant isolates</b>	<b>Percentage (%)</b>
NIT	130	94.2
NAL	123	89.1
TCY	2	1.4
AMP	2	1.4
FOX	2	1.4
CAZ	1	0.7
CIP	1	0.7
SXT	1	0.7
CHL	0	0
STR	0	0
IMP	0	0
GEN	0	0
NIT*	3	2.2
STR*	1	0.7

Ampicillin (AMP), Chloramphenicol (CHL), Tetracycline (TCY), Cefoxitin (FOX), Ceftazidima (CAZ), Streptomycin (STR), Ciprofloxacin (CIP), Gentamicin (GEN), Imipenem (IMP), Nalidixic acid (NAL), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (STX), and Nitrofurantoin (NIT).

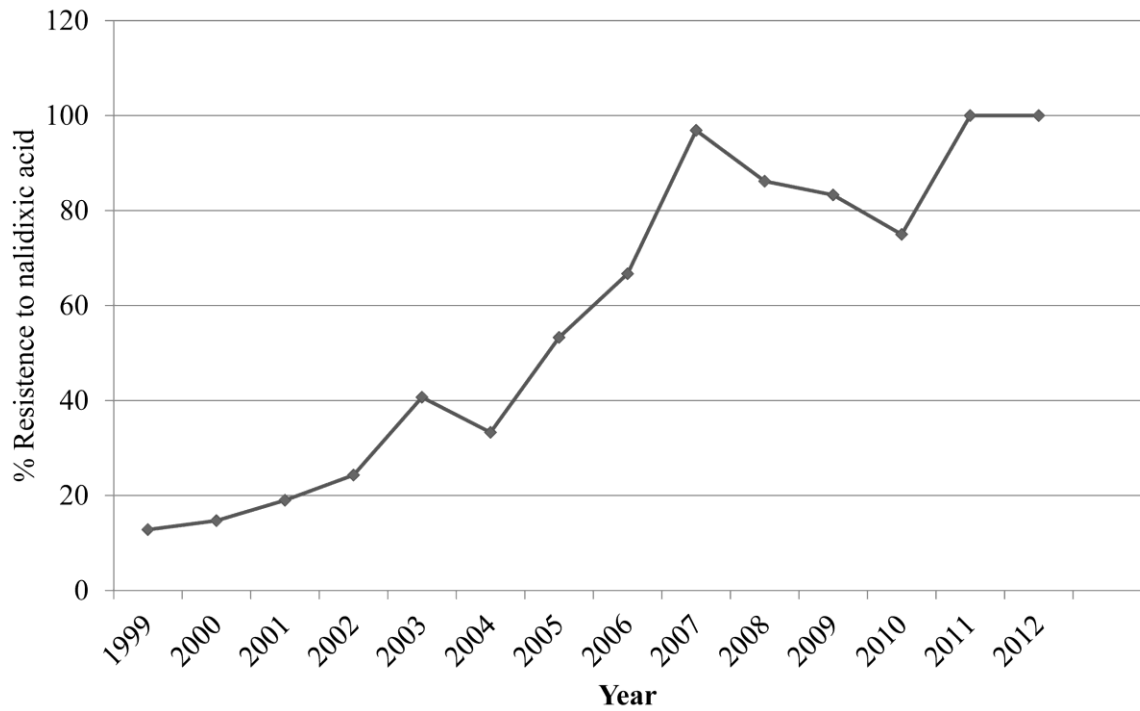
\* Intermediate resistance.

**Table 4.** Antimicrobial resistance profiles of *S. Enteritidis* involved in salmonellosis in the State of Rio Grande do Sul, Brazil, from 2007 to 2012.

<b>Antimicrobial profile</b>	<b>Number of isolates</b>
NIT	12
NAL	4
NAL, NIT	111
NAL, TCY	1
NAL, NIT, SXT	1
NAL, NIT, TCY	3
NAL, NIT, AMP, FOX, CIP	2
NAL, NIT, AMP, FOX, CAZ	1
NIT*	2
STR*	1

Ampicillin (AMP), Chloramphenicol (CHL), Tetracycline (TCY), Cefoxitin (FOX), Ceftazidima (CAZ), Streptomycin (STR), Ciprofloxacin (CIP), Gentamicin (GEN), Imipenem (IMP), Nalidixic acid (NAL), Trimethoprim/Sulfamethoxazole (STX), and Nitrofurantoin (NIT).

\* Intermediate resistance.



**Figure 1.** Increase in the percentage of resistance to nalidixic acid (NAL) of *S. Enteritidis* isolated from foods involved in outbreaks in the state of Rio Grande do Sul, Brazil, from 1999 to 2012. Source: Geimba et al. (2005); Oliveira et al. (2006); De Paula et al. (2011) and present results from this study.

**2.2 Artigo 2 – PCR-Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil, from 2007 to 2013**

Artigo a ser submetido na *Journal of Food Safety*.

**PCR-Ribotyping of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil, from 2007 to 2013**

PCR-Ribotyping *S. Enteritidis* foodborne outbreaks Brazil, 2007-2013

Roberta Capalonga<sup>1</sup>, Rosane Campanher Ramos<sup>2</sup>, Jane Mari Correa Both<sup>2</sup>, Mara Lúcia Tiba Soeiro<sup>2</sup>, Solange Mendes Longaray<sup>2</sup>, Simone Haas<sup>2</sup>, Eduardo Cesar Tondo<sup>1\*</sup>

1. Department of Food Sciences, Laboratory of Microbiology and Food Control, Federal University of Rio Grande do Sul, Institute of Food Science and Technology (ICTA/UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

2. Foundation of Production and Health Research of Rio Grande do Sul, Central Laboratory of the State of Rio Grande do Sul (FEPPS/IPB/LACEN/RS), Division of Product Analyses (DAP), Section of Microbiology, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

\* Corresponding author: Eduardo César Tondo – Avenue Bento Gonçalves, 9500 – CEP: 91501-970 – ICTA UFRGS – E-mail: [tondo@ufrgs.br](mailto:tondo@ufrgs.br) – (0055 51) 3308-6677.

## **ABSTRACT**

Since 1997, *Salmonella* has been identified as the main etiological agent of foodborne diseases in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil. From 1999 to 2006, the phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* responsible for foodborne outbreaks in RS has indicated the involvement of only three closely related clones of *S. Enteritidis*. The aim of this study was to characterize the *S. Enteritidis* isolates involved in foodborne salmonellosis of the State of RS, from 2007 to 2013. *S. Enteritidis* isolates (n=116) were identified and typed by PCR-Ribotyping. The results demonstrated that a unique PCR-Ribotyping pattern was found among isolates, and this pattern was found in previous years, indicating that the same strain of *S. Enteritidis* remain involved with salmonellosis outbreaks, since 1999, in the State of Southern Brazil.



**Keywords:** salmonellosis outbreaks, Southern Brazil, *Salmonella* Enteritidis, PCR-ribotyping

## **PRACTICAL APPLICATIONS**

The results of this study demonstrated that a specific banding PCR-Ribotyping pattern was found among isolates of *S. Enteritidis* responsible for foodborne outbreaks in the State of Rio Grande do Sul (RS), Southern Brazil, from 2007 to 2013. The same banding pattern was identified in the majority of *S. Enteritidis* isolates responsible for salmonellosis outbreaks during 1999 to 2006, in the State of RS. Previous studies named this strain as *S. Enteritidis* SE86. Based on these results, *S. Enteritidis* SE86 was identified as the causative agent of several salmonellosis outbreaks in Southern Brazil during the period of 1999 to 2013.

## **INTRODUCTION**

In Brazil, a significant increase in the incidence of *S. Enteritidis* in humans and foods involved with salmonellosis outbreaks have been recorded in the last decade (Tondo and Ritter, 2012, Brazil, 2013, Fuzihara *et al.* 2000; Santos *et al.* 2000; Tavechio *et al.* 1996; Tavechio *et al.* 2002). Since 1997, the Division of Health Surveillance of the State of RS (DHS/RS) has pointed *Salmonella* as the leading cause of foodborne diseases in this State of 10.700 million people (Costalunga and Tondo, 2002; Oliveira *et al.* 2006; Silveira and Tondo, 2006; Oliveira *et al.* 2010; Tondo and Ritter, 2012; Wagner *et al.* 2013). Different studies have shown that three closely related clones of *S. Enteritidis* were responsible for the majority of foodborne salmonellosis occurred from 1999 to 2006 and the most involved strain was named SE86 (Oliveira *et al.* 2010; Tondo and Ritter, 2012). Due to the increased number of salmonellosis caused by SE86 and the importance to public health of this strain in the State of RS, several scientific studies have been conducted in order to identify the principal characteristics of this microorganism (Geimba *et al.* 2004; Costalunga and Tondo, 2002; Oliveira *et al.* 2006; Silveira and Tondo, 2006; Oliveira *et al.* 2007; Malheiros *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2009; Oliveira *et al.* 2010; De Paula *et al.* 2011; Tondo and Ritter, 2012; Wagner *et al.* 2013; Capalonga *et al.* 2014 *in press*). However, since 2006, the molecular characterization of *S. Enteritidis* isolates involved with outbreaks in this State has not been

performed. The aim of this study was to characterize *S. Enteritidis* isolated from foods involved with foodborne outbreaks occurred in Southern Brazil, between 2007 and 2013.

## **MATERIALS AND METHODS**

*S. Enteritidis* were isolated from foods involved with salmonellosis outbreaks occurred in different cities of the State of RS, from January 2007 to May 2013. The State of RS is one of 27 Brazilian States and has a population of approximately 10.7 million people distributed in 497 cities. Salmonellosis outbreaks were investigated by sanitary and epidemiological surveillance officers who, when possible, carried out sampling of suspected foods. Sampled foods were transported to the Official Central laboratory of the State of RS in order to be analysed Foundation of Production and Health Research of Rio Grande do Sul, Central Laboratory of the State of Rio Grande do Sul (FEPPS/IPB/LACEN/RS). The isolation and biochemical identification of *Salmonella* isolates were performed according to the methods described by Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (APHA, 2001). Isolates identified as *Salmonella* were sent to the Laboratory of *Enterobacteriaceae*, at National Reference Center for Intestinal Bacterial Infections, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ) (Rio de Janeiro, Brazil) to be serotyped following methods described by Kauffman (1972). Official reports containing information on the isolated microorganisms were prepared by FIOCRUZ and sent to FEPPS/IPB/LACEN/RS. 116 Isolates identified as *S. Enteritidis* were sent to the Laboratory of Microbiology and Food Control, Institute of Science and Technology, Federal University of Rio Grande do Sul (ICTA/UFRGS) in order to be characterized by PCR-Ribotyping.

### **PCR-Ribotyping**

Genomic DNA was extracted by thermal treatment, as follows: an inoculum of each isolate was inoculated into 5 mL of BHI broth (Himedia, Mumbai, India) and incubated for 24 hours at 37° C. After incubation, 1 mL of sample was centrifuged at 5000 rpm for 4 minutes in an Micro 120 Hettich Zentrifugen microcentrifuge at room temperature. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 1 mL of TE (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDA, pH 8.0). This step was repeated three times. After, the pellet was suspended in 100 µL

of TE and kept in a heat block for 10 minutes at 95° C, and then centrifuged at 5000 rpm for 1 min. The supernatant was used in PCR reactions as described below.

The primers used were previously described by Jensen *et al* (1993), and were specific for amplification of the spacer region between the 16S and 23S rRNA genes. The sequences of the primers were 5'CAAGGCATCCACCGTGT3' and 5'GTGAAGTCGTAACAAGG3'. Each set of PCR reactions included a control without template DNA. Each reaction in 23 µL contained 2.5 µL of reaction buffer (100 mmol L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.8, 750 mmol L<sup>-1</sup> KCl), 0.5 µL of 10 mmol L<sup>-1</sup> dNTPs, 1 µL de 50 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 2 µL of each primer (20 pmol), 0.2 µL de Taq DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 14,8 µL, sterile ultrapure water (milliQ) and 2 µL of DNA. The program PCR-Ribotyping consisted of one cycle of pre-incubation at 94° C for 2 min, followed by 25 cycles of 94° C for 15 s, 55° C for 4 min and 72° C for 1 min, and a step of final extension at 72° C for 30 min. All PCR analyzes were performed in the Minicycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) and the amplification products were separated by horizontal agarose gel electrophoresis using TBE buffer and 2 %. The gels were stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. Samples showing weak bands were reanalyzed in order to confirm the banding patterns. Patterns were visually compared and assigned to the same profile when the patterns were identical.

## RESULTS

The analysis of PCR-Ribotyping was able to identify an unique banding pattern for the 116 samples of *S. Enteritidis* strains isolated between 2007 and 2013.

Figure 1 presents the identified profile of analysed samples.

## DISCUSSION

In the present study, the primers developed by Jensen *et al* (1993) were able to type strains of *S. Enteritidis* involved in foodborne outbreaks in the State of RS, 2007-2013. The same technique and the same primers were used in further studies for typing *S. Enteritidis* involved in salmonellosis in the State of RS, demonstrating suitability for this purpose (Geimba *et al.* 2004; Oliveira *et al.* 2007; Oliveira *et al.* 2009). Even though several other molecular methods has been used to type *S. Enteritidis* isolated in RS, PCR-Rybotyping was

chosen because demonstrated the same results of other techniques and is easier to perform. For example, Geimba *et al* (2004) considered the PCR-Ribotyping very reproducible and appropriate for typing of *S. Enteritidis* involved in foodborne outbreaks in the State of RS, 1999-2000. These authors identified two closely related profiles between 75 strains typified. Later, Oliveira *et al* (2010) used different molecular techniques (PCR-Ribotyping and Pulsed-field gel electrophoresis - PFGE) for typing *S. Enteritidis* involved in salmonellosis occurred in the RS from 1999 to 2006 and highlighted the suitability, low cost and good reproducibility of PCR-Ribotyping for molecular characterization of these microorganisms. In the same study, Oliveira *et al* (2010) identified three closely related banding patterns of PCR-Ribotyping among 80 strains of *S. Enteritidis* analyzed. The profile identified in the present study was similar to one of the three profiles identified by Oliveira *et al* (2010), indicating that the same strain of *S. Enteritidis* have caused salmonellosis outbreaks in several cities of the State RS, in the last 14 years.

*S. Enteritidis* has been considered as the main causative agent of gastroenteritis in humans in several countries as United States (CDC, 2009, Cho *et al.* 2010), China (He *et al.* 2011), England and Wales, (Hughes *et al.* 2007). In fact, these studies showed that *S. Enteritidis* has been, if not the most, one of the main agents of foodborne diseases in the world.

In Brazil, isolates of *S. Enteritidis* were also identified in the States of São Paulo (Tavechio *et al.* 2002), Paraná (Alcocer *et al.* 2006; Kottwitz *et al.* 2008) and Santa Catarina (Koerich *et al.* 2008) as the main causative agent of salmonellosis outbreaks. In the State of RS, a recent study investigated the foods involved in foodborne outbreaks in RS, 2007 to 2012, and showed that *S. Enteritidis* continued to be frequently isolated from suspected foods (Capalunga *et al.* 2014 *in press*). Another study (Fischer, 2014) analyzed various microorganisms isolated from foods involved and foodborne diseases occurred in the State of RS, from 2004 to 2013 and showed that the percentage of isolation of *Salmonella* spp. has been decreased in RS since 2009. According to the author this result could be attributed to the public health strategies for control and prevention of *Salmonella* in foods.

*S. Enteritidis* SE86 has been investigated by different researches, revealing interesting characteristics of this microorganism. For example, SE86 revealed an increasing antimicrobial resistance to nalidixic acid, from 1999 to 2012. In 1999, 12.8 % of the isolates were resistant

to this antibiotic, while in 2012 100 % of the isolates showed to be resistant to this drug (Tondo and Ritter, 2012; Capalonga *et al.* 2014 *in press*). SE86 was able to grow faster in homemade mayonnaise than *S. Typhimurium* and *S. Bredeney*. This food preparation is considered the principal vehicle of salmonellosis in the State of RS, between 1997 to 2012 (Costalunga and Tondo, 2002; Silveira and Tondo, 2006, Wagner *et al.* 2013; Capalonga *et al.* 2014 *in press*). In another study, Malheiros *et al.* (2007) exposed SE86 to sub-lethal pH for a few hours and this organism become 7.5 times more acid-resistant than *S. Bredeney* and *S. Typhimurium*. Thereafter, the acid-adapted SE86 was exposed to simulated gastric fluid at pH 1.5 and demonstrated increased rates of survival when compared to SE86 nonacid-adapted or *S. Bredeney* or *S. Typhimurium* (Perez *et al.*, 2011). Perez *et al.* (2011) demonstrated that acid adapted SE86 were more virulent than other serovars of *Salmonella* after infection of germ-free mice. All those characteristics may be contributing to SE86 be an important foodborne agent in the Southern Brazil.

Based on the results of the present study, SE86 was isolated from foods involved in salmonellosis occurred in the State of RS, between 1999 and 2013, and the characterization of this important foodborne pathogen must be carried out in order to follow its control in the southern Brazil.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank to all the Sanitary Surveillance Officers and FEPPS/IPB/LACEN who have worked hard in order to improve the food safety of the State of Rio Grande do Sul. Special thanks to the Director of FEPPS/IPB/LACEN, Dra. Raquel Fiori de Souza, and Dra. Denise Figueiredo, of Epidemiological Surveillance Service of RS for her intense dedication to the Public Health of the State of Rio Grande do Sul.

### **REFERENCES**

ALCOCER, I., DE OLIVEIRA, K.M.P., VIDOTTO, M.C., OLIVEIRA, T.C.R.M. 2006. Discrimination of *Salmonella* serovars isolated from chicken meat by REP and ERIC-PCR and phagotyping of Enteritidis serovars. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26(2), 414-420.

APHA (American Public Health Association) 2001. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 th Edition. Washington.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde- SVS 2013. Dados Epidemiológicos- DTA – Período de 2000 a 2013. <http://www.saude.gov.br/svs> (accessed January 30, 2014).

CAPALONGA, R., RAMOS, R.C., BOTH, J.M.C., SOEIRO, M.L.T., SOLANGE, S.M., HASS, S. and TONDO, E.C. 2014 *in press*. *Salmonella* serotypes, resistance patterns and food vehicles of salmonellosis occurred in southern Brazil, 2007 – 2012. J Infect Developing Countries.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). 2009 – FoodNet 2007 Surveillance Report. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services.

CHO, S., WHITTAM, T.S., BOXRUD, D.J., BARTKUS, J.M., RANKIN, S.C., WILKINS, M.J., SOMSEL, P., DOWNES, F.P., MUSSER, K.A., ROOT, T.P., WARNICK, L.D., WIEDMANN, M. and SAEED, A.M. 2010. Use of multiple-locus variable number tandem repeat analysis and phage typing for subtyping of *Salmonella* Enteritidis from sporadic human cases in the United States. Journal of Applied Microbiology. 108, 859-867.

COSTALUNGA, S. and TONDO E.C. 2002. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 a 1999. Brazilian Journal of Microbiology. 33, 342–346.

DE PAULA, C.M.D., RITTER, A.C., PIETA, L., DO AMARAL, P.H. and TONDO, E.C. 2011. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil from 2003 to 2006. Journal of Microbiology and Antimicrobials. 3(9), 233-240.

FISCHER, M.M. 2014 Contaminação microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridas no Estado do Rio Grande do Sul ocorridas entre 2004 e 2012. Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/87565/000910316.pdf?sequence=1>. (accessed March 15, 2014).

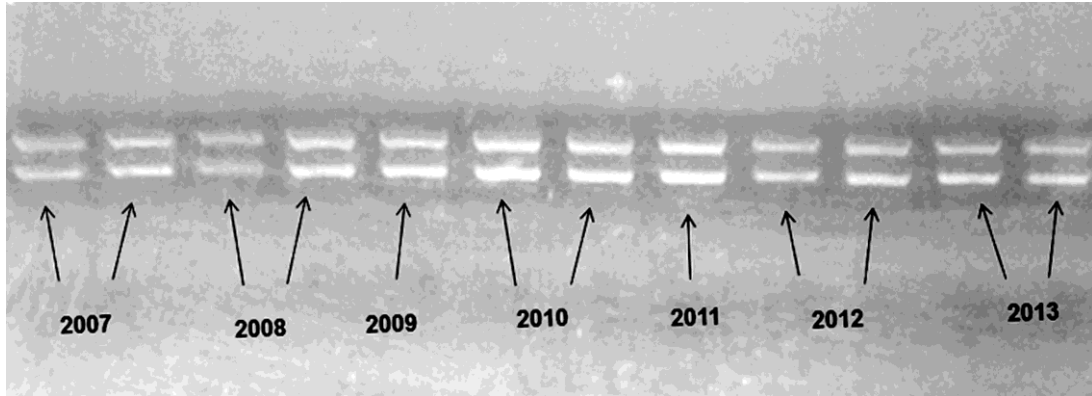
- FUZHARA, T.O., FERNANDES, S.A., and FRANCO, B.D.G.M. 2000. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. *Journal of Food Protection*. 63, 1749-1753.
- GEIMBA, M.P., TONDO, E.C., DE OLIVEIRA, F.A., CANAL, C.W., and BRANDELLI, A. 2004. Serological characterization and prevalence of spvR genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. *Amsterdam. J. Food Prot.* 67(6), 1229-1233.
- HE, G-Z., FENG, Y., TIAN, W-I., QIAN, N., DENG, S-X. and AN, C-W. 2011. Populations of *Salmonella* Enteritidis in Orally Infected White Chinese Goose. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 10(17), 2234-2239.
- HUGHES, C., GILLESPIE, I.A. and O'BRIEN, S.J. The Breakdowns in Food Safety Group. 2007. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. *Food Control*. 18, 766–772.
- JENSEN, M. A., WEBSTER, J. A. and STRAUS, N. 1993. Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied Environmental Microbiology*. 59, 945–952.
- KAUFFMAN F. 1972. Kauffmann-White Schema. In: *Serological diagnosis of Salmonella species*. Copenhagen: Munksgaard, pp. 59-123.
- KOERICH, G.M.D., DE LUCA, A.N.B., PHILIPPI, J.M.S. and DA ROSA, C.M.A. 2008. Análise dos surtos de DTA causados por *Salmonella* sp em Santa Catarina, Brasil, de 2006 a 2008. D. Ciências da Saúde - 3. Saúde Coletiva - 4. Saúde Pública. 62<sup>a</sup> Reunião Anual da SBPC. <http://www.sbpcnet.org.br/livro/62ra/resumos/resumos/1078.htm>. (accessed August 12, 2012).
- KOTTWITZ, L.B.M., BACK, A., LEÃO, J.A., ALCOCER, I., KARAN, M. and OLIVEIRA, T.C.R.M. 2008. Contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 60(2), 496-498.
- MALHEIROS, P.S., PAULA, C.D.M. and TONDO, E.C. 2007. Avaliação da cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com outros sorovares. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 27, 751-755.

- OLIVEIRA, F.A., BRANDELLI, A. and TONDO, E.C. 2006. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *The New Microbiologica*. 29, 49–54.
- OLIVEIRA, F.A., FRAZZON, A.P.G., BRANDELI, A. and TONDO, EC. 2007. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. *J Infect Developing Countries*., 1(2): 170-176.
- OLIVEIRA, F.A., GEIMBA, M.P., PASQUALOTTO, A.P., BRANDELLI, A., PASQUALI, G., DA SILVA, W.P. and TONDO, E.C. 2009. Clonal relationship among *Salmonella* enterica serovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. *Food Control*. 20, 606–610.
- OLIVEIRA, F.A., PASQUALOTTO, A.P., DA SILVA, W.P. and TONDO, E.C. 2010. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. *Food Research International*.
- PEREZ, K.J., MARTINS, F.S., CARA, D.C., NICOLI, J.R. and TONDO, E.C. 2011. Evaluation of intestinal invasion in germ free mice challenge with acid-adapted and non acid-adapted *Salmonella* Enteritidis SE86 and *Salmonella* Typhimurium ST99. *Journal of Food Safety*. 32(1), 108-114.
- SILVEIRA, J.B. and TONDO, E.C. 2006. Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001. In: *International Symposium Salmonella and Salmonellosis. Epidemiology and Public Health*. Saint Malo, France, Sessão 5, Editora: Pierre Colin e Geneviève Clément, p. 521-522.
- TAVECHIO, A.T., FERNÁNDES, S.A., NEVES, B.C., DIAS, A.M.C. and IRINO, K. 1996. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* enteritidis in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 38, 315-322.
- TAVECHIO, A.T., GHILARDI, Â.C.R., PERESI, J.T.M., FUZIHARA, T.O., YONAMINE, E.K., JAKABI, M. and FERNANDES, S.A. 2002. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. *J Food Prot*. 65(6), 1041-1044.



TONDO, E.C. and RITTER, A.C. 2012. “*Salmonella* and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade” - “*Salmonella*: Classification, Genetics and disease Outbreaks”, editado pela Nova Science Publishers, Inc, Nova York, USA. ISBN: 978-161-942-928-4.

WAGNER, V.R., SILVEIRA, J.B. and TONDO, E.C. 2013. Salmonellosis in the State of Rio Grande do Sul, southern Brazil, 2002 to 2004. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(3), 723-729.



**Figure 1:** PCR-Ribotyping profile of *S. Enteritidis* isolated from foods involved in salmonellosis outbreaks in Southern, Brazil, during the years 2007 and 2013.

## **CAPÍTULO 3**

### 3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As salmoneloses são apontadas como um importante problema de saúde pública em muitos países. No Brasil, a legislação exige a ausência de *Salmonella* spp. em alimentos (BRASIL, 2001), porém esse microrganismo é frequentemente isolado em amostras envolvidas em surtos alimentares. No Estado do RS a investigação de surtos alimentares envolvendo *Salmonella* é realizada de forma sistemática pelos órgãos de Vigilância Epidemiológica e Sanitária dos municípios e Estado, sendo seu isolamento recorrente, uma vez que sempre que possível os agentes coletam amostras de alimentos suspeitos e encaminham à Seção de Microbiologia de Água e Alimentos, do Laboratório Central do Estado, para análise microbiológica. Os resultados dessas análises são de grande importância para o fechamento da pesquisa pelo Setor de Epidemiologia e confirmação dos surtos alimentares ocorridos no RS.

Desde 1999, há uma parceria entre o Laboratório Central do Estado e o Laboratório de Microbiologia e Controle de Alimentos, do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos – ICTA/UFRGS, para a investigação e caracterização das *Salmonella* envolvidas em surtos alimentares, já que esse patógeno vem sendo apontado, há quase duas décadas, como o principal agente causador de DTA no Sul do Brasil.

Neste trabalho foram caracterizadas cepas de *Salmonella* envolvidas em salmoneloses no RS, no período de 2007 a 2013. Do total de isolados analisados, *S. Enteritidis* foi o principal sorovar identificado (84,7 %). Esse mesmo sorovar foi identificado em 97 % dos isolados envolvidos em salmoneloses, entre os anos de 1999 e 2000, no Estado do RS (GEIMBA et al., 2004). Durante o período de 2001 e

2002, resultados semelhantes foram encontrados por Oliveira et al. (2006), no qual identificaram *S. Enteritidis* em 93 % das amostras analisadas nesse mesmo Estado. Ainda, entre os anos de 2003 a 2006, *S. Enteritidis* continuou sendo identificado como o principal sorovar envolvido (87 %) (DE PAULA et al., 2011). Sendo assim, esses resultados demonstram que *S. Enteritidis* tem sido o principal sorovar envolvido em salmonelose, no Estado do RS, desde 1999. Além da identificação no Sul do Brasil, países como Estados Unidos (CDC, 2009; CHO et al., 2010) e China (HE et al., 2011), por exemplo, identificaram *S. Enteritidis* como um dos principais agentes causadores de gastroenterites.

Entre os alimentos envolvidos em salmoneloses do RS, a maionese caseira (17,39 %) é apontada como o principal alimento envolvido, seguido dos produtos de confeitaria (15,94 %) e carnes (12,32 %). Desde 1997, a maionese caseira vem sendo relatada como principal veículo causador de salmoneloses no Sul do Brasil (COSTALUNGA & TONDO, 2002; SILVEIRA & TONDO, 2006). Da mesma forma, Wagner et al. (2013) apontaram alimentos à base de ovos como o principal agente etiológico causador de surtos. Já Fischer (2014) demonstrou que há uma tendência no decréscimo de contaminação da categoria de alimentos “ovos”, nos últimos anos, no RS e que esse fato pode estar relacionado à elaboração de estratégias de prevenção e controle de surtos, como por exemplo: a publicação da Portaria 78/2009, da Secretaria Estadual de Saúde (SES/RS) e os cursos de Boas Práticas obrigatórios para os responsáveis pela manipulação de alimentos em serviços de alimentação do Estado.

Como parte da caracterização das *Salmonella*, o presente trabalho investigou a resistência das *S. Enteritidis* envolvidas em surtos de origem alimentar a 12

agentes antimicrobianos e identificou altas porcentagens de resistência para nitrofurantoína (94,2 %) e ácido nalidíxico (89,1%). Um fato interessante a ser destacado é o crescente aumento da resistência ao ácido nalidíxico, sendo que nos anos de 2011 e 2012 todas as amostras foram resistentes a esse agente. Tondo & Ritter (2012) consideram que a resistência aos antibióticos está aumentando rapidamente em todo o mundo, e o uso indiscriminado e indevido de antibióticos tem facilitado o surgimento de resistência em vários sorovares de *Salmonella*. Além desses autores, Silva & Duarte (2002) também consideram que o uso de antibióticos em alimentos para aves, principalmente das quinolonas, pode propiciar o desenvolvimento de *S. Enteritidis* resistentes. Em diferentes partes do mundo há um acréscimo da resistência antimicrobiana o que pode indicar a disseminação de cepas epidêmicas resistentes ou multi-resistentes (CRUCHAGA et al., 2001), o que comprova os resultados do presente estudo quando observou-se que diversos isolados de *S. Enteritidis* apresentaram resistência a mais de um antimicrobiano.

Mürmann et al. (2008) analisaram alimentos envolvidos em surtos alimentares no Estado do RS, no ano de 2005, e relataram que existia um mesmo grupo clonal de *S. Enteritidis*, uma vez que as amostras apresentaram um único perfil de macrorestrição. Além desses autores, outros estudos demonstraram que três clones estreitamente relacionados de *S. Enteritidis* foram responsáveis pelas salmoneloses ocorridas no Estado do RS, desde 1999, sendo essa cepa denominada SE86 (OLIVEIRA, et al., 2010b; TONDO & RITTER, 2012). Para confirmar ainda mais a ideia de que um mesmo clone é responsável pelas salmoneloses no Estado, o presente estudo avaliou, através de PCR-Ribotipificação, os isolados de *S. Enteritidis* envolvidos em surtos ocorridos entre os anos de 2007 e 2013, e a partir

dos resultados pôde-se observar que somente um perfil de bandas foi identificado, sugerindo que a mesma cepa de *S. Enteritidis* causou diferentes surtos alimentares no Estado do RS.

Estudos demonstraram que quando comparado com outros sorovares, a *S. Enteritidis* SE86 demonstrou maior capacidade de adaptação ácida e térmica, além de maior resistência contra diferentes sanificantes, principalmente o hipoclorito de sódio (MALHEIROS et al., 2008; TONDO et al., 2010; MACHADO et al., 2011). Ainda, Perez et al. (2011) demonstraram que a *S. Enteritidis* SE86 ácido adaptada foi mais virulenta do que outros sorovares de *Salmonella*, após a infecção de camundongos gnotobiotos. Todas essas características podem estar contribuindo para SE86 ser um importante agente de origem alimentar no sul do Brasil há mais de uma década.

A partir dos resultados do presente estudo conclui-se que um mesmo clone de *S. Enteritidis* vem causando surtos de origem alimentar no Estado do RS, de 1999 a 2013, e que apesar de Fischer (2014) apontar um decréscimo no isolamento de *Salmonella* spp. a partir de 2009, considera-se importante o monitoramento e acompanhamento desse microrganismo envolvido em surtos alimentares, já que a identificação e caracterização da bactéria pode contribuir na elaboração de estratégias de redução, controle e prevenção de surtos de salmonelose no Estado do RS.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. Regulamento técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, 02 de jan. 2001. Seção 1.

CASTELANI, L.; DUARTE, K.M.R. Métodos moleculares em microbiologia de alimentos. **PUBVET**, Londrina. v. 5, n. 2, 2011.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). FoodNet 2007 Surveillance Report. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services, 2009.

CHO, S. et al. Use of multiple-locus variable number tandem repeat analysis and phage typing for subtyping of *Salmonella* Enteritidis from sporadic human cases in the United States. **Journal of Applied Microbiology**. v. 108, p. 859–867, 2010.

COSTALUNGA, S.; TONDO E.C. Salmonellosis in Rio Grande do Sul, 1997 a 1999. **Brazilian Journal Microbiology**. v. 33, p. 342–346, 2002.

CRUCHAGA, S. et al. Antimicrobial resistance in salmonellae from humans, food and animals in Spain in 1998. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 47, p. 315–321, 2001.

DE PAULA, C.M.D.; et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil from 2003 to 2006. **Journal of Microbiology and Antimicrobials**. v. 3(9), p. 233–240, 2011.

FARBER J.M. et al. **Molecular typing and differentiation**. In.: Farber J.M. et al (Ed). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D.C.: APHA. cap. 11, p. 127–158, 2001

FISCHER, M.M. Contaminação microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridas no Estado do Rio Grande do Sul ocorridas entre 2004 e 2012. Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia de Alimentos – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/87565/000910316.pdf?sequence=1>>. Acesso em: março de 2014.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança dos Alimentos**. 2ª ed. Artmed, Porto Alegre, 2013.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004.



FREITAS, F.A.D.; SIQUEIRA, H.R.; ALBANO, R.M. Métodos moleculares na tuberculose e resistência do *Mycobacterium tuberculosis*. **Pulmão RJ**. v.18, n. 2, p. 96–101, 2009.

GANDRA, E.A. et al, Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Scientiarum Technology**. Maringá. v.30, n. 1, p. 109–118, 2008.

GEIMBA, M.P. et al. Serological characterization and prevalence of *spvR* genes in *Salmonella* isolated from foods involved in outbreaks in Brazil. Amsterdam. **Journal of Food Protection**. v. 67, n. 6, p. 1229–1233, 2004.

GEIMBA, M.P.; TONDO, E.C.; BRANDELLI, A. Antimicrobial Resistance in *Salmonella* Enteritidis Isolated from Foods Involved in Human Foodborne Outbreaks Occurred in the South of Brazil, 1999 – 2000. **Journal of Food Safety**. v. 25, n. 3, p. 173–182, 2005.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. Barueri, SP: Manole, 2008. 317 p.

GREIG, J.D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported internationally for source attribution, **International Journal of Food Microbiology**. v. 130(2), p. 77–87, 2009.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Paris, n. 9, 2007

GÜRTLER, V., MAYALL, B.C. Genomic approaches to typing, taxonomy and evolution of bacterial isolates. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, p. 3–16, 2001.

HE, G-Z. et al. Populations of *Salmonella* Enteritidis in Orally Infected White Chinese Goose. **Journal of Animal and Veterinary Advances**. v. 10(17), p. 2234–2239, 2011.

HUGHES, C. et al. Foodborne transmission of infectious intestinal disease in England and Wales, 1992–2003. **Food Control**. v. 18, p. 766–772, 2007.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

KAUFFMAN, F. **Kauffmann-White Schema**. In: SEROLOGICAL diagnosis of *Salmonella* species. Copenhagen: Munksgaard, 1972.

LANDERAS E.; MENDOZA, C. Evaluation of PCRbased methods and ribotyping performed with a mixture of *Pst* I and *Sph* I to differentiate strains of *Salmonella* serotype Enteritidis. **Journal of Medical Microbiology**. v. 4, p. 427–434, 1998.

MACHADO, T.R.M. et al. Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação dos desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 475–481, 2011.

MALHEIROS P.S.; DE PAULA, C.M.D.; TONDO, E.C. Growth kinetics of *Salmonella* Enteritidis involved in outbreaks of foodborne illness in Rio Grande do Sul, southern Brazil: a comparison with other serovar strains. **Ciência Tecnologia de Alimentos**. v. 27(4), p. 751–755, 2007.

MALHEIROS, P.S. et al. Acid and thermal resistance of a *Salmonella* Enteritidis strain involved in several foodborne outbreaks. **Journal of Food Safety**, v. 29 (2), p. 302–317, 2008.

MALORNY, B.; SCHROETER, A.; HELMUTH, R. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates from Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, p. 2278–2282, 1999.

MARIMON, J.M. et al. Increasing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella* enterica isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 3, p. 576–57, 2004.

MÜRMAN, L. et al. Quantification and molecular characterization of *Salmonella* isolated from food samples involved in salmonellosis outbreaks in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.39, n.3, p. 529–534, 2008.

NCCLS – Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100- S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, 19087-1898 USA, 2005.

OLIVEIRA, S.D. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**. v. 97, p. 297–305, 2005.

OLIVEIRA, F.A.; BRANDELI, A.; TONDO, E.C. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. **The New Microbiologica**. v. 29, p. 49–54, 2006.

OLIVEIRA, F.A. et al. Clonal relationship among *Salmonella* enterica sorovar Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. **Food Control**. v. 20, p. 606–610, 2009.

OLIVEIRA, A.B.A. et al. Doenças Transmitidas por Alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais: uma revisão. **Rev HCPA**. v. 30(3), p. 279–285, 2010a.

OLIVEIRA, F.A. et al. Characterization of *Salmonella* Enteritidis isolated from human samples. **Food Research International**. 2010b.

- PEREZ, K.J. et al. Evaluation of intestinal invasion in germ free mice challenge with acid-adapted and non acid-adapted *Salmonella* Enteritidis SE86 and *Salmonella* Typhimurium ST99. **Journal of Food Safety**. v. 32(1), p. 108–114, 2011.
- POPOFF, M.; LE MINOR. **Antigenics formulas of Salmonella serovars**. In: National *Salmonella* Center by the WHO. Collaborating Centre of Research on *Salmonella*. Paris: Institute Pasteur, 1997.
- POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L.L. Supplement 2001 (n°.45) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, v.154(3), p. 173–174, 2003.
- THRELFALL E. J., DAY, M., DE PINNA, E. Drug-resistant enteric fever in the UK. **Lancet**. v. 367, p.1576, 2006.
- TONDO, E. C. et al. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.41. 2010.
- TONDO, E.C.; RITTER, A.C. “**Salmonella and Salmonellosis in Southern Brazil: a review of the last decade**” “*Salmonella*: Classification, Genetics and disease Outbreaks”, editado pela Nova Science Publishers, Inc, Nova York, USA. ISBN: 978–161–942–928–4, 2012.
- TONDO, E.C.; BARTZ, S. **Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos**. 2ª ed. Ed. Sulina, Porto Alegre, 2014. 263 p.
- SANT’ANA, T.M. et al. Salmonelose em Animais Silvestres e Exóticos. **Rev. Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. Ano VI. n. 11, 2008.
- SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**. v. 2(4), p. 85–100, 2002.
- SILVEIRA, J.B.; TONDO, E.C. **Salmonellosis outbreaks occurred in Rio Grande do Sul, Southern Brazil, during 2000 to 2001**. In: International Symposium *Salmonella* and salmonellosis. Epidemiology and Public Health. Saint Malo, France, Sessão 5, Editora: Pierre Colin e Geneviève Clément, p. 521–522, 2006.
- WAGNER, V.R., SILVEIRA, J.B. and TONDO, E.C. Salmonellosis in the State of Rio Grande do Sul, southern Brazil, 2002 to 2004. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44(3), p. 723–729, 2013.
- WELKER, C.A.D et al. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 44–48, 2010.
- YANG, S.J. et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and

genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**. v. 86, p. 295–301, 2002.