

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE

**Análise da variabilidade de características
fenotípicas e genotípicas em cepas de *Salmonella*
ser Enteritidis submetidas a diferentes doses de
radiação gama inoculadas em ovos SPF (*Specific
Pathogens Free*)**

Elizabeth Cristina dos Praseres Rodrigues

2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

**Análise da variabilidade de características fenotípicas e genotípicas em
cepas de *Salmonella* ser Enteritidis submetidas a diferentes doses de
radiação gama inoculadas em ovos SPF (*Specific Pathogens Free*)**

ELIZABETH CRISTINA DOS PRASERES RODRIGUES

Sob a Orientação da Professora
Norma dos Santos Lázaro

e Co-Orientação da Dra.
Dália dos Prazeres Rodrigues

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em
Ciência de Alimentos**, no Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

**Seropédica, RJ
Novembro de 2011**

579.344
R696a
T

Rodrigues, Elizabeth Cristina dos Praseres,
1960-

Análise da variabilidade de características fenotípicas e genotípicas em cepas de *Salmonella* ser Enteritidis submetidas a diferentes doses de radiação gama inoculadas em ovos SPF (Specific Pathogens Free) / Elizabeth Cristina dos Praseres Rodrigues - 2011.

113 f. : il.

Orientador: Norma dos Santos Lázaro.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Bibliografia: f. 71-87.

1. Salmonela - Teses. 2. Salmonela - Genética - Teses. 3. Salmonela - Efeito dos raios gama - Teses. 4. Ovos - Contaminação - Teses. I. Lázaro, Norma dos Santos, 1949-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ELIZABETH CRISTINA DOS PRASERES RODRIGUES

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM 29/11/2011

Norma dos Santos Lázaro

Norma dos Santos Lázaro. Prof.Dr. Ph.D. FIOCRUZ
(Orientadora)

Ernesto Hofer

Ernesto Hofer.. Prof.Dr.L.Doc. FIOCRUZ

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.. Pro.Dr. Ph.D. UFC

Mauro Carlos Lopes Souza

Mauro Carlos Lopes Souza.. Prof.Dr. Ph.D. UFRJ

Paulo César Augusto de Souza

Paulo César Augusto de Souza. Prof.Dr. Ph.D. UFRRJ

DEDICATÓRIA

A Deus,

que apesar dos meus erros e imperfeições tem me dado forças para lutar.

*E em especial a minha fé religiosa , como católica, que me
conduziu e não permitiu que ficasse hesitante em
minhas ações, que nada faltasse em todos os meus dias, me
dando saúde, força, coragem e sabedoria para
superar os obstáculos e obter esta conquista.*

A minha querida mãe Liberalina que tem me apoiado de várias maneiras com o seu exemplo de força, dedicação, compreensão e ensinamentos e pelo seu exemplo de integridade.

Ao meu querido pai Artur “*in memorian*”, cuja tênue lembrança física não reduz o carinho e força ofertados.

A minha querida filha Marianna pelo seu carinho, amor, compreensão, paciência e por ter suportado a saudade em alguns momentos de minha ausência...

A minha irmã Dália pela sua grande amizade e companheirismo. Obrigada pela força, solidariedade e incentivos constantes no decorrer de toda minha vida... Você é muito especial!

Ao meu cunhado Alvaro pelo apoio e colaboração durante essa jornada

Aos quatro grandes amigos “*in memorian*” Sebastião Januário da Silva, José Caetano Alves, Junair Ribeiro e Deise Paranhos Feitosa que tanto contribuíram com minha formação profissional e pessoal.

AGRADECIMENTOS

Cumpre apresentar minha gratidão a todos aqueles que de modo amigo, contribuíram na execução deste trabalho.

À Fundação Oswaldo Cruz, representada pelo seu presidente Dr. Paulo Ernani Gadelha Vieira, pelos recursos técnicos científicos ofertados para a execução deste trabalho

Ao Diretor de Biomanguinhos Dr. Arthur Luiz Correa, pelo apoio e estímulo a formação de seus profissionais

Ao Dr. Akira Homma que conduziu minhas ações e me deu a oportunidade de encontrar meu caminho profissional.

A Diretora do Instituto Oswaldo Cruz, Dra. Tânia Araújo Jorge pela infra-estrutura e possibilidade de fortalecer meu conhecimento.

A Dra. Dália P. Rodrigues, Chefe do Laboratório de Enterobactérias da FIOCRUZ, pelos recursos ofertados. Um agradecimento especial pela atenção, disponibilidade, carinho e ensinamentos na área de microbiologia.

Ao Prof. Dr. Ernesto Hofer do Laboratório de Zoonoses Bacterianas/IOC pelo apoio e orientação durante todos os momentos de minha vida profissional.

À Pesquisadora Assistente Dra. Eliane Moura Falavina dos Reis, pela ajuda e orientação prestadas durante a realização deste trabalho.

A amiga Renata Garcia Costa pelo constante incentivo e companheirismo.

Ao colega Andre Felipe das Mercês Santos, pela valiosa colaboração na análise das cepas pelo PFGE.

A Rossiane Moura Souza da Área de Biotecnologia do Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro, PESAGRO, RJ pela amizade e colaboração na análise dos genes de virulência.

Aos Técnicos e Tecnologistas do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz, Evaldo Soares da Silva, Elso Onofre da Silva, Maiara dos Santos de Araújo, Marcia Lima Festivo, Emily Moraes Roges, Roberta Laine de Souza, Gutierre de Andrade da Silva, Thaís Guimarães Martins, Esther Helena Rondon Barretto Prado e Ingrid Annes Pereira pelo carinho, amizade e apoio no desenvolvimento das atividades Laboratoriais.

Ao colega Álvaro Jose Velloso, do Laboratório de Febre Amarela, Biomanguinhos/FIOCRUZ, pelo fornecimento dos ovos *SPF*, para o desenvolvimento desta Tese.

Ao Chefe Edmilson Domingos da Silva do Laboratório de Tecnologia e Desenvolvimento de Biomanguinhos, pela compreensão e estímulo.

Ao amigo José Damasceno Fernandes, da Vice Presidência de Gestão e Desenvolvimento Institucional – VPGDI/FIOCRUZ, pela orientação e apoio logístico sempre presentes.

Aos colegas de Biomanguinhos, pela amizade e estímulo durante o curso.

Às profissionais da Secretaria do Laboratório de Enterobactérias, Viviane da Silva Cruz e Giselle Marques Correa, que com seu jeitinho tranqüilo sempre prontas a solucionar quaisquer necessidades.

Ao Dr. Mauro Carlos Lopes de Souza, pelo apoio e “dicas” nos procedimentos de irradiação.

Aos Drs. Ricardo Tadeu Lopes e Edgar Francisco Oliveira de Jesus pelas facilidades ofertadas no Laboratório de Instrumentação Nuclear – COPPE/UFRJ, para a irradiação dos ovos.

Ao colega Sandro S. Toledo, COPPE/UFRJ, por sua sempre presente disponibilidade nos procedimentos de irradiação.

Aos profissionais do Departamento de Apoio Técnico e Tecnológico (DATT/IOC), pelo apoio nas atividades de esterilização e lavagem.

Ao corpo docente e discente do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRRJ, pelo incentivo durante a obtenção dos créditos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, em especial às Professoras Arlene Gaspar e Stella Regina Reis da Costa pelo apoio e confiança.

À minha co-orientadora Prof^ª Dr^ª. Dália dos Praseres Rodrigues, com quem muito aprendi cuja competência foi fundamental na minha formação. Um agradecimento especial pela atenção, disponibilidade, carinho e ensinamentos na área de microbiologia.

À minha orientadora Prof^ª Dr^ª. Norma dos Santos Lázaro pela confiança quando aceitou me orientar, por compartilhar seus conhecimentos ao longo da realização deste trabalho, pela paciência, compreensão e estímulo.

RESUMO

Rodrigues, Elizabeth Cristina dos Praseres. **Análise da variabilidade de características fenotípicas e genotípicas em cepas de *Salmonella* ser Enteritidis submetidas a diferentes doses de radiação gama inoculadas em ovos SPF (*Specific Pathogens Free*)**. 2011. 127 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

O reconhecimento de *Salmonella* ser. Enteritidis como um patógeno emergente em ovos tem ocasionado uma crescente preocupação nos consumidores quanto a segurança alimentar. A contaminação dos ovos por este microrganismo ocorre desde a sua formação até o processamento para o consumo, destacando-se a extraordinária capacidade deste sorovar infectar os ovos, durante a sua formação no ovário da galinha (transmissão vertical) ou quando os ovos estão expostos a um ambiente contaminado e os microrganismos penetram através da casca (transmissão horizontal). O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da radiação gama ^{60}Co em doses variando 0,49-10,0 kGy, sobre as características fenotípicas e genotípicas de *Salmonella* ser. Enteritidis em ovos SPF. Considerando que a possibilidade de contaminação pode ser do tipo vertical e/ou horizontal, o processo de irradiação foi desenvolvido em duas etapas. Na primeira um grupo de 20 cepas foram submetidas a contaminação vertical (inoculação diretamente na gema) e na segunda etapa, foram comparados o comportamento de cinco cepas submetidas a contaminação horizontal (casca) e vertical. No cômputo geral, a totalidade apresentou resistência a dose de até 1 kGy e variável suscetibilidade às doses de 1,5 kGy a 3,0 kGy. Entre todas as cepas analisadas, a dose de 5,0 kGy foi mais efetiva na redução e/ou eliminação da carga bacteriana inoculada, com apenas duas cepas resistentes, as quais foram submetidas a irradiação de 10 kGy, resultando em uma cepa resistente a esta dose (cepa 92). Não houve diferença na suscetibilidade das cepas a irradiação, considerando as vias de contaminação dos ovos. Entre as alterações fenotípicas, destacaram-se a fermentação da lactose e da sacarose, não utilização do citrato como única fonte de carbono, ausência de produção de sulfeto de hidrogênio e lisina descarboxilase negativa em número variável de subculturas, pós-irradiação, assinalando-se ainda a conversão fágica em uma cepa. Não houve diferença na suscetibilidade a irradiação gama entre as cepas primariamente produtoras ou não de biofilme. Por outro lado a irradiação induziu a mudanças nos perfis de resistência a antimicrobianos, particularmente aos betalactâmicos não havendo porém, relação entre a perda e expressão de genes de resistência e doses de irradiação. Da mesma forma, independente da dose utilizada, a irradiação induziu a mudanças nos perfis de genes localizados em Ilhas de Patogenicidade possivelmente reduzindo o potencial patogênico das cepas irradiadas. A avaliação destas amostras através do PFGE aponta variações muito tênues, indicando que alterações detectadas em nível de DNA não apresentam magnitude capaz de ser detectada pela PFGE.

Palavras-Chave: *Salmonella* ser. Enteritidis, ovos, irradiação gama

ABSTRACT

Analysis of the variability of phenotypic and genotypic characteristics of *Salmonella* serovar Enteritidis submitted to different ^{60}Co radiation doses inoculated into SPF (Specific Pathogens Free) eggs.

Salmonella ser. Enteritidis as an emerging pathogen in eggs has caused a growing concern among consumers about food safety. The egg contamination by this microorganism occurs during their formation in the ovary of the chicken (vertical transmission) or when eggs are exposed to a contaminated environment and microorganisms penetrate through the shell eggs (horizontal transmission). The goal of this study was to determine the effects of ^{60}Co gamma irradiation at doses ranging from 0.49 to 10.0 kGy, on the phenotypic and genotypic characteristics of *Salmonella* ser. Enteritidis in SPF eggs contaminated vertical and / or horizontal and submitted to the irradiation process developed in two stages. In a first, 20 strains were inoculated directly into the yolk and the second step, we compared the behavior of five strains subjected to horizontal contamination (egg shell) and vertical. Overall, all showed resistance to the dose of 1 kGy and variable susceptibility to 1.5 kGy to 3.0 kGy. The dose of 5.0 kGy was more effective with only two resistant strains, which have undergone irradiation of 10 kGy, resulting in a strain resistant to this dose (strain 92). There was no difference irradiation, of strains subjected to horizontal and, vertical contamination of eggs. Among the phenotypic characteristics, the highlights were the fermentation of lactose and sucrose, not use citrate, lack of hydrogen sulfide production and lysine decarboxylase negative in some subcultures, post-irradiation and, pointing to even the conversion of a phage strain. There was no difference in susceptibility to gamma irradiation among strains which producing or not biofilm. On the other hand irradiation induced changes in the profiles of antimicrobial resistance, particularly to beta-lactam although no relationship between the loss and expression of resistance genes and doses of irradiation. Likewise, regardless of dose, irradiation induced changes in the profiles of genes located in its pathogenicity islands-SPI into the pathogenic potential of strains irradiated. The evaluation of these strains by PFGE indicating that changes detected at the DNA level have no magnitude can be detected by PFGE.

Keywords: *Salmonella* ser. Enteritidis, eggs, gamma irradiation

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

Nº	Tabelas	Pág.
1	Características fenotípicas das 20 cepas utilizadas nos ensaios de irradiação	28
2	Características das cinco cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis empregadas no ensaio de contaminação horizontal	31
3	Suscetibilidade de cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis frente a diferentes doses de irradiação gama (kGy) em ovos SPF submetidos a contaminação horizontal	43
4	Suscetibilidade de cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis frente a diferentes doses de irradiação gama (kGy) em ovos SPF submetidos a contaminação vertical	44
5	Distribuição dos isolados de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis recuperados, de acordo com o período e dose de irradiação	44
6	Alterações fenotípicas observadas nas cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis pós-irradiação	47
7	Suscetibilidade aos antimicrobianos de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis entre as cepas analisadas, antes e após a irradiação.....	48
8	Produção de biofilme por <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis antes e após a irradiação	49
9	Amostras selecionadas para a detecção de genes de resistência através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	51
10	Genes de resistência a ceftriaxona e quinolonas, detectados nas cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis antes e após a irradiação.....	51
11	Genes de virulência detectados nas cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis e respectivas subculturas	53

Quadros

1	Distribuição do número de sorovares de acordo com espécie e subespécie de <i>Salmonella</i>	6
2	Caracterização fenotípica das espécies e subespécies de <i>Salmonella</i> spp	8
3	Cronologia da aprovação de produtos para irradiação	23
4	Drogas utilizadas para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana	34
5	Parâmetros de avaliação da capacidade de produção de biofilme...	35
6	Relação dos “primers” utilizados na caracterização de genes de resistência antimicrobiana e condições de amplificação	36
7	Relação dos “primers” utilizados na caracterização de genes de virulência	37

LISTA DE TABELAS, QUADROS E FIGURAS

(Continuação)

Nº	Figuras	Pág.
1	Diagrama de um ovo	20
2	Radura: Símbolo internacional que indica que o alimento foi irradiado	25
3	Percentuais de cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis resistentes às diferentes doses de irradiação	41
4	Evolução da recuperação de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis em função da dose de irradiação e período de análise	41
5	Recuperação de <i>Salmonella</i> Enteritidis de acordo com a carga microbiana (log UFC/mL), período e dose de irradiação	42
6	Frequência de recuperação de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis de acordo com a carga microbiana (log UFC/mL), dose de irradiação e tempo pós-irradiação	42
7a	Características das colônias de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis pós-irradiação	45
7b	Características das colônias de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis pós-irradiação	46
8	Característica de colônia de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis pós-irradiação Cepa 3305 Lactose positiva (3kGy)	46
9	Distribuição dos 35 isolados de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis quanto a produção de biofilme	50
10	Eletroforese em gel de agarose para caracterização de <i>gyrB</i> e <i>bla_{CTX}</i> em <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis antes e após irradiação.....	52
11	Representação gráfica dos genes de virulência detectados na cepa 3305 de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis e suas subculturas resultantes de diferentes doses de irradiação	54
12	Representação gráfica dos genes de virulência detectados na cepa 3597 de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis e suas subculturas resultantes de diferentes doses de irradiação	54
13	Representação gráfica dos genes de virulência detectados na cepa 92 de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis e suas subculturas resultantes de diferentes doses de irradiação.....	55
14	Eletroforese em gel de agarose para caracterização de genes de virulência nas cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis (3305, 3597 e 92) antes e pós-irradiação.....	74
15	Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) de cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis, antes e após irradiação, submetidas à restrição com a enzima <i>XbaI</i>	56
16	Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) de cepas de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis, antes e após irradiação, submetidas à restrição com a enzima <i>BlnI</i>	57

FLUXOGRAMAS

1	Esquema de inoculação/irradiação dos ovos submetidos a contaminação vertical	30
2	Esquema de inoculação/irradiação dos ovos submetidos a contaminação horizontal e vertical	32

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

µL	Microlitro
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CDC –	Centers for Disease Control and Prevention
CO ⁶⁰	Cobalto-60
DO	Densidade Ótica
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
Gy	Gray
kGy	kilogray
M	Molar
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
mM	milimol
°GL	Gay Lussac
pb	pares de bases
PBS	Salina Tampão Fosfato
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
rpm	Rotação por minuto
S.	<i>Salmonella</i>
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
SPI	Ilha de Patogenicidade de <i>Salmonella</i>
TSB	Caldo Triptosado de Soja
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colônia/mL
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1.	Gênero <i>Salmonella</i>	5
2.1.1.	Características gerais, nomenclatura e classificação	5
2.1.2.	Característica Clínicas.....	8
2.1.3.	Patogenicidade	9
2.1.4.	Ecologia	11
2.1.5.	Epidemiologia	12
2.2.	<i>Salmonella</i> spp.em Alimentos	15
2.3.	Importância Econômica e Social da Avicultura Brasileira	17
2.3.1.	A carne de frango	17
2.3.2.	Produção de ovos	18
2.3.3.	Ovo: estrutura e função	19
2.4.	<i>Salmonella</i> em ovos.....	21
2.5.	Controle de <i>Salmonella</i> - Irradiação de Alimentos	21
2.6.	Efeitos da irradiação gama sobre os microorganismos.....	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1.	Amostragem	26
3.1.1.	<i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	26
3.1.2.	Critérios laboratoriais para a seleção das cepas.....	26
3.1.3.	Ovos	26
3.2.	Metodologia	26
3.2.1.	Padronização do inóculo para os ensaios de irradiação (contaminação vertical e horizontal)	27
3.2.2.	Procedimentos de irradiação: Ovos submetidos a contaminação vertical	27
3.2.2.1.	Obtenção do inóculo	27
3.2.2.2.	Inoculação da suspensão de <i>Salmonella</i> ser.Enteritidis diretamente na gema.....	28
3.2.2.2.1	Confirmação experimental do procedimento.....	28
3.2.2.2.2	Procedimento de inoculação	29
3.2.2.3.	Irradiação dos ovos	29
3.2.2.4.	Recuperação e contagem de UFC/mL de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	29
3.2.3.	Procedimentos de irradiação: ovos submetidos a contaminação horizontal	30
3.2.3.1.	Obtenção do inóculo	31
3.2.3.2.	Contaminação dos ovos e procedimentos de irradiação	31
3.2.3.3.	Recuperação e contagem de UFC/mL de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	31

(Continuação)

3.2.4.	Avaliação das características fenotípicas e genotípicas de <i>Salmonella</i> Enteritidis pós-irradiação	32
3.2.4.1.	Confirmação bioquímica	32
3.2.4.2.	Caracterização antigênica	32
3.2.4.3.	Manutenção e estoque dos isolados	33
3.2.4.4.	Fagotipagem	33
3.2.4.5.	Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos	33
3.2.4.6.	Avaliação semi-quantitativa para a produção de biofilme	34
3.2.5.	Avaliação das características genotípicas	35
3.2.5.1.	Caracterização molecular dos genes de resistência antimicrobiana	35
3.2.5.1.1.	Tratamento da amostra, extração e purificação do DNA	35
3.2.5.1.2.	PCR convencional	36
3.2.5.2.	Detecção dos genes de virulência	36
3.2.5.2.1.	Extração do DNA bacteriano	37
3.2.5.2.2.	Amplificação do DNA bacteriano	37
3.2.5.2.3.	Detecção do produto amplificado	38
3.2.5.3.	Determinação do perfil genômico (PFGE)	38
3.2.5.3.1.	Preparação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano	38
3.2.5.3.2.	Extração e purificação do DNA bacteriano	38
3.2.5.3.3.	Seleção da endonuclease de restrição e digestão do DNA	39
3.2.6.	Análise dos resultados	39
4.	RESULTADOS	40
4.1.	Determinação dos inóculos para os ensaios de irradiação	40
4.2.	Ensaio de irradiação	40
4.2.1.	Características visuais dos ovos pós-irradiação.....	40
4.2.2.	Recuperação e contagem de UFC/mL de <i>Salmonella</i> ser. Enteritidis	40
4.2.2.1.	Contaminação vertical	40
4.2.2.2.	Contaminação horizontal e vertical	43
4.3.	Avaliação das características fenotípicas	44
4.3.1.	Características coloniais	44
4.3.2.	Características bioquímicas	47
4.3.3.	Confirmação da integridade antigênica	47
4.3.4.	Fagotipagem	47
4.3.5.	Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos	48
4.3.6.	Avaliação da produção de biofilme	49
4.4.	Alterações genotípicas observadas nas cepas pós-irradiação	50
4.4.1.	Caracterização molecular da resistência antimicrobiana	50
4.4.2.	Caracterização molecular da virulência	52
4.4.3.	Relacionamento clonal através de PFGE	56
5.	DISCUSSÃO	58
6.	CONCLUSÕES	69
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	70
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

(Continuação)

9. ANEXOS;	88
Anexo A.	Características dos genes de virulência pesquisados.....	89
Anexo B.	Protocolos de PCR	90
Anexo C.	Suscetibilidade de cepas <i>de Salmonella</i> ser. Enteritidis frente a diferentes doses de irradiação gama (kGy) em ovos SPF submetidos a contaminação vertical	92
Anexo D.	Meios, Reagentes e Soluções	94

1. INTRODUÇÃO

"Todas as pessoas tem o direito de esperar que os alimentos que irão consumir sejam inócuos e aptos para o consumo. As enfermidades e danos por eles provocados são, no melhor dos casos, desagradáveis e no pior podem ser fatais. Mas há, além disso, outras conseqüências: os surtos de enfermidades transmitidas pelos alimentos podem prejudicar o comércio, o turismo, provocar absenteísmo, desemprego e questões judiciais. Além disso, a deterioração dos alimentos ocasiona perdas podendo interferir negativamente no comércio e na confiança dos consumidores" (CODEX. 1997).

As doenças transmitidas por alimentos (DTA) talvez sejam um dos problemas de saúde mais evidente no mundo contemporâneo, devido à emergência de novos microorganismos patogênicos, à reemergência de outros e ao desenvolvimento de novos produtos alimentícios. A preocupação com a qualidade dos alimentos envolve não só os riscos de veiculação de agentes de enfermidades para o consumidor, como também perdas econômicas para o produtor.

As camadas menos favorecidas da população, geralmente, são as mais afetadas pela contaminação alimentar, devido aos hábitos culturais da alimentação e à necessidade de optar por produtos com menor preço, geralmente de pior qualidade e mais contaminados.

Conseqüentemente, a questão da segurança alimentar tem sido tema pertinente não apenas em estudos científicos, como também nas questões de ordem político-econômica dos países de todo o mundo, recebendo inclusive, a atenção de regulamentos, consumidores e da mídia, resultando em uma crescente necessidade de elaborar avaliações específicas que forneçam dados que permitam um balizamento de medidas de controle microbiológico de qualidade para esses produtos.

Apesar do extraordinário avanço tecnológico nas áreas de genética, nutrição, manejo e a utilização de equipamentos modernos, que permitem produtividade animal em níveis elevados, o impacto social e econômico das doenças veiculadas através de alimentos de origem animal é considerável. Obviamente, a presença de *Salmonella* spp. é uma condição constante e que exige por parte das indústrias, adoção de procedimentos que não venham resultar em danos futuros, necessitando de contínuas ações para seu controle.

Considerando que a principal via de transmissão de *Salmonella* está na cadeia alimentar, os altos índices relatados, sobretudo associados a produtos de origem animal, apontam estes microorganismos como dos mais incidentes e relevantes agentes etiológicos de enteroinfecções.

Embora uma gama muito grande de alimentos esteja envolvida na sua transmissão ao homem, merecem destaque entre os produtos de origem animal, os ovos e subprodutos contaminados.

A despeito do desenvolvimento da avicultura, existe uma constante preocupação em relação aos programas sanitários e de segurança alimentar com vistas à redução de patógenos, que envolve toda a cadeia tanto em nível de abatedouro quanto de produção, para que tenhamos cada vez mais, produtos de melhor qualidade no mercado.

Na ânsia de diminuir o perigo representado por microorganismos que possam ser veiculados pelos alimentos e, paralelamente, prolongar a vida de prateleira dos seus produtos, visando a maior ganho econômico durante a comercialização, as indústrias de alimentos adotando diferentes processos tecnológicos, destacando-se a irradiação de alimentos a qual representa um método promissor. Seu uso com critérios bem estabelecidos pode representar mais uma fonte de controle desta zoonose para os produtores, além de abrir a possibilidade de

exportação deste produto em larga escala. Esse processo, embora com suas bases científicas e mecanismos de ação já estabelecidos e compreendidos pela comunidade científica e sendo considerado pelas agências internacionais reguladoras como um processo tradicional, é uma técnica cuja implementação na linha de processamento de alimentos que vem ainda sendo temida pela grande maioria das indústrias.

A conservação de alimentos pela irradiação é recomendada pela Organização Mundial de Saúde e por dois órgãos da Organização das Nações Unidas: FAO e AIEA e aprovado pelo **Codex Alimentarius**. A segurança dessa tecnologia seja sob o ponto de vista toxicológico, físico, químico, biológico ou nutricional, vem sendo avaliada em vários países, porém no Brasil, este processo ainda é pouco divulgado, compreendido e utilizado.

Para cada alimento são estabelecidos procedimentos específicos, inclusive diferentes doses de radiação. Embora possa ser considerado método efetivo para frutas e legumes, sua utilização nos produtos avícolas, nem sempre pode garantir ao consumidor proteção contra doenças transmitidas por alimentos.

Por outro lado, a cadeia produtiva de frango de corte no Brasil foi ampliada, tornando-se destaque no cenário mundial, o que resultou na reestruturação industrial e aumento da produtividade. Paralelamente, a evolução do conhecimento quanto à qualidade da carne, aliada ao custo mais reduzido, acelerou a produção, para atender o mercado interno, onde representa parte da dieta de grande parcela da população.

Mesmo com a rígida vigilância, visando à redução de patógenos, desde a linha de produção até a comercialização, o controle de *Salmonella* é extremamente difícil, tendo em vista que alguns sorovares, particularmente *Salmonella* ser. Enteritidis podem ser transmitidos verticalmente, tornando também os ovos possíveis fontes de transmissão. Isto é facilitado ainda por sua manutenção no comércio à temperatura ambiente, cujo clima tropical favorece a multiplicação. Aliado a isto, estes são amplamente utilizados na alimentação, cujo hábito de consumo da maioria da população brasileira é com cocção parcial ou ainda ausente em diferentes pratos de nossa culinária. Isto resulta no constante envolvimento em surtos de infecção alimentar, apontando para a necessidade de implantar medidas de controle mais eficazes, que garantam qualidade e segurança.

No Brasil, trabalhos científicos vêm sendo realizados em diversos centros de pesquisa, entretanto, ainda são poucos aqueles que estudam as conseqüências advindas do emprego dessa tecnologia sobre as características da microbiota presente nos alimentos.

Reconhecendo esta lacuna e considerando a importância dos ovos como veículos de *Salmonella*, os quais se tornam infectados por um processo de transmissão vertical, colonizando o oviduto, ou transmissão horizontal, por contaminação fecal da casca, salienta-se a importância de estudos que avaliem a segurança microbiológica deste produto bem como o efeito da irradiação gama sobre as características feno e genotípicas deste microrganismo e até que ponto esta variabilidade, pode representar um risco para a saúde humana.

Assim, o presente estudo teve com objetivo conhecer e avaliar o efeito de diferentes doses de irradiação gama sobre a população de *Salmonella* ser. Enteritidis utilizando como modelo de alimento de origem animal, ovos SPF (*Specific Pathogens Free*), cujo conjunto de informações permitirá:

1. Determinar a dose de irradiação gama bactericida para *Salmonella* spp inoculadas diretamente na gema em ovos SPF;
2. identificar e avaliar a sobrevivência e migração de *Salmonella* ser. Enteritidis utilizando como modelo, contaminação horizontal dos ovos SPF;
3. Avaliar o efeito das diferentes doses de irradiação gama no perfil bioquímico e antigênico de *Salmonella* ser. Enteritidis pós-irradiação;
4. Analisar a estabilidade das características lisogênicas das cepas após submetidas a

- diferentes doses de irradiação;
5. Reconhecer alterações no perfil de resistência aos antimicrobianos, previamente determinado;
 6. Avaliar e confrontar as cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis antes e pós-irradiação quanto a capacidade de produzir biofilme;
 7. Analisar a estabilidade genômica dos genes de resistência e dos genes de virulência reconhecidos nas cepas, através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
 8. Avaliar através de PFGE a ocorrência de variações no perfil clonal de *Salmonella* ser. Enteritidis submetidas a diferentes doses de irradiação.

1. REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos anos a ocorrência de diversos episódios relacionados a alimentos no cenário internacional, em particular envolvendo os transgênicos, resíduos químicos e possível transmissão das doenças da “vaca louca” e “gripe aviária” vem despertando o interesse público em relação à segurança alimentar.

A esse respeito, a Conferência Internacional em Nutrição da FAO/OMS, ocorrida em 1992, reconheceu que o acesso ao alimento nutricionalmente adequado e seguro é um direito de todo o indivíduo, e apontou a elevada ocorrência de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ou água contaminada (WHO, 2002).

Alimentos de origem animal como carnes, ovos, leite e seus derivados são os mais freqüentemente envolvidos em DTA e representam importante desafio aos órgãos de saúde pública em todo mundo (VEDTA/FNS/MS, 2002; WHO, 2005).

Aos fatores citados acrescentam-se outros determinantes na incidência das DTA, tais como o aumento nas tendências das populações por alimentos destinados ao pronto consumo coletivo (*fast-food*); oferta/consumo em vias públicas, particularmente nos países emergentes; mudança de hábitos alimentares aliados a utilização de novas modalidades de produção; aumento no uso de aditivos, sem deixar de considerar as facilidades atuais de deslocamento da população, inclusive em nível internacional; mudanças ambientais e globalização (WHO, 2002; FAO, 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2005) mais de 1400 diferentes microorganismos são relatados na etiologia das DTA, dos quais cerca de 538 representados por espécies bacterianas, entre estas 58% são zoonóticas.

Entre os agentes patogênicos veiculados por alimentos citam-se: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, entre outros destacando-se *Salmonella* spp como um dos microorganismos mais freqüentemente envolvidos em casos isolados e surtos de doenças de origem alimentar em vários países, incluindo o Brasil, acometendo todas as idades, sendo de maior gravidade para crianças e idosos (GERMANO; GERMANO, 2001). Nos Estados Unidos (EUA) o CDC (2011) estima que a cada ano cerca de 1 em cada 6 americanos (ou 48 milhões de pessoas) ficam doentes, 128.000 são hospitalizadas e 3.000 morrem de doenças transmitidas por alimentos. Entre os cinco principais patógenos que contribuem para doenças comunitárias transmitidas por alimentos, *Salmonella* ocupa o segundo lugar (11% dos casos), após Norovirus (58%), estimado em 1.027.561 doentes, sendo a primeira maior causa de hospitalizações (35%) e de mortes por doenças de transmissão alimentar (28%).

Enquanto nos países desenvolvidos a notificação compulsória permite o conhecimento quanto à incidência da infecção humana, com possibilidade de estimativa dos danos causados pela doença, naqueles emergentes, incluindo o Brasil, a notificação não é obrigatória, exceto para *Salmonella* ser. Typhi, o que resulta na impossibilidade de análise, inclusive sob o aspecto econômico. Acrescenta-se ainda a escassa bibliografia disponível sobre sua casuística, bem como os reflexos para a Saúde Pública e fatores como a ocorrência de infecção humana por salmonela, ser mais usual de forma esporádica que em surtos e o hábito da automedicação (WHO, 2001).

2.1. Gênero *Salmonella*

2.1.1. Características gerais, nomenclatura e classificação

O gênero *Salmonella* cujo nome foi dado em homenagem ao Dr. Daniel Elmer Salmon, médico veterinário e bacteriologista do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, no século XIX, pertence à família Enterobacteriaceae, sendo estreitamente relacionado a *Escherichia*, *Yersinia* e *Shigella* e contém um cromossoma circular de aproximadamente 4.7 Mbp com um conteúdo GC de 52% (KORSAK; CLINQUART; DAUBE, 2004). Compreende bacilos Gram-negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos que produzem ácido e gás a partir de glicose com exceção de *Salmonella* ser. Typhi, *Salmonella* ser. Pullorum e *Salmonella* ser. Gallinarum ($\leq 5\%$ produzem gás). Também fermentam arabinose, maltose, manitol, manose, ramnose, sorbitol, trealose, xilose e dulcitol (BRASIL, 2011; EWING, 1986; COSTA; HOFER, 1972).

As salmonelas reduzem nitrato a nitrito, são oxidase negativa e catalase positiva e capazes de crescer utilizando citrato como única fonte de carbono. Geralmente, produzem H₂S, descarboxilam a lisina e ornitina e não hidrolisam a uréia (EWING, 1986; COSTA; HOFER, 1972).

A maioria das salmonelas de interesse clínico é não fermentadora de lactose, o que contribui para diferenciação de colônias nos meios de isolamento contendo lactose (FERREIRA; CAMPOS, 2008).

Geralmente móveis por meio de flagelos peritríquios, exceto *Salmonella* ser. Pullorum e *Salmonella* ser. Gallinarum, que são imóveis (EWING, 1986).

As salmonelas possuem antígenos (antígenos somáticos “O”, de parede celular; antígeno Vi (capsular) e antígenos “H”, de flagelos) que permitem discriminá-las em sorovares com a ajuda de soros aglutinantes monoespecíficos

O antígeno somático (O) localiza-se na fração lipopolissacarídica da parede celular bacteriana. Esta fração é formada por um lipídio (lipídio A) que contém endotoxinas responsáveis pela febre no hospedeiro, quando atingem a corrente sanguínea) ligado a uma porção polissacarídica (cerne – comum a todas as salmonelas), de onde partem cadeias laterais monossacarídicas. Estas são bastante específicas, determinando o antígeno (O) de cada espécie. Em alguns casos, as salmonelas podem não apresentar o antígeno (O) quando cultivadas, formando colônias irregulares (rugosas), não-tipáveis (EWING, 1986; COSTA; HOFER, 1972).

Os antígenos flagelares (H) são de natureza proteica (flagelina) e localizam-se nos flagelos bacterianos os quais, por sua vez também são estruturas protéicas, que se prolongam para além da parede da célula bacteriana, sendo responsáveis pela mobilidade. Ocorrem em duas fases (1 e 2), identificados por letras minúsculas (fase 1) e por números arábicos (fase 2) (FERREIRA; CAMPOS, 2008; EWING, 1986; COSTA; HOFER, 1972).

Algumas salmonelas não possuem flagelos (imóveis), outras são monofásicas (possuem flagelos de uma só fase), mas a grande maioria são bifásicas (possuem flagelos de fase 1 e fase 2). A síntese dos diferentes antígenos H, fase 1 e fase 2 é codificada pelos genes *FliC* e *FljB*, respectivamente, e o gene *FljB* pode ou não estar funcionando, e quando isso ocorre ele forma o flagelo de fase 2, bem como, uma proteína repressora do gene *FliC* (FERREIRA; CAMPOS, 2008).

O antígeno capsular (Vi) é apenas encontrado em três sorovares de *Salmonella*: *Salmonella* ser. Typhi, *Salmonella* ser. Dublin e *Salmonella* ser. Paratyphi C (GRIMONT; WEILL, 2007).

Os antígenos diferem em termos de resistência térmica, sendo o antígeno somático (O) termorresistente (suporta aquecimento a 100 °C por duas horas, sem ser destruído), e os

antígenos capsular e flagelar, termolábeis. Essa característica é importante na determinação do sorotipo, pois os antígenos (Vi) que recobrem a célula devem ser removidos e para isso utiliza-se o aquecimento (GRIMONT; WEILL 2007; EWING, 1986; COSTA; HOFER 1972).

Os trabalhos de Schütze (1920), prosseguidos por White (1929), demonstraram que as salmonelas poderiam ser identificadas por meio de seus antígenos, utilizando-se soros aglutinantes monoespecíficos.

Em 1929, Kauffmann (apud BIER, 1985), tomando como ponto de partida os estudos de Bruce White, elaborou uma tabela diagnóstica (Esquema de Kauffmann-White), na qual a tipificação sorológica se baseia na identificação dos antígenos (“O”, “Vi” e “H”).

A atual classificação é baseada em estudos fenotípicos e genotípicos e dividem o gênero em apenas duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo a primeira subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica* (GRIMONT; WEILL, 2007). Atualmente o gênero apresenta 2610 sorovares identificados (GUIBOURDENCHE et al., 2010) cuja distribuição encontra-se no Quadro 1.

Quadro 1. Distribuição do numero de sorovares de acordo com espécie e subespécie de *Salmonella*

Espécies/Subespécies	Sorovares
<i>Salmonella enterica</i>	
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	1547
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>salamae</i>	513
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	100
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	341
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>houtenae</i>	73
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>indica</i>	13
<i>Salmonella bongori</i>	23
Total	2610

Anteriormente a taxonomia do gênero *Salmonella* foi estabelecida tomando por base a distribuição em subgeneros e os sorovares, tratados como espécies. Então, *Salmonella* era dividida em subgenero I (*S. enterica* subsp. *enterica*), II (*S. enterica* subsp. *salamae*), III (formalmente genero *Arizona*; subdividido em IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae* e IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*), IV (*S. enterica* subsp. *houtenae*), V (*S. bongori*), and VI (*S. enterica* subsp. *indica*) (GRIMONT; WEILL, 2007).

A designação dos sorovares evoluiu com o tempo. Alguns eram designados com base na síndrome clínica por eles determinada como, por exemplo, *S. typhi* e *S. paratyphi* A, B, C. Outros eram designados de acordo com a síndrome e especificidade de hospede (*S. abortus-ovis*, *S. abortus-equi*), porém alguns sorovares como *S. typhi-murium* e *S. cholerae-suis*, foram erroneamente incluídos nessa categoria. Posteriormente, para evitar possíveis confusões, foram adotados nomes indicando a origem geográfica da primeira linhagem de um novo sorotipo (*S. london*, *S. panama*, *S. tele-kebir*) (GRIMONT; WEILL, 2007).

No Congresso Internacional de Microbiologia realizado em Moscou (Int. J. Syst. Bacteriol., 1968., 18, 191-196), decidiu-se que nomes compostos seriam doravante condensados em nomes simples (*S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. telekebir*). Esses nomes, erroneamente considerados como espécies, eram por essa razão em itálico (GRIMONT; WEILL, 2007).

Atualmente, os nomes dos sorovares são mantidos apenas para subespécie *enterica* por representarem mais de 99,5% das cepas de *Salmonella* isoladas. Esses nomes não são escritos em itálico e a primeira letra é maiúscula. Portanto, os seguintes exemplos estão corretos: *S. enterica* subsp. *enterica* sorovar Typhimurium ou *S. enterica* serovar Typhimurium ou *Salmonella* ser. Typhimurium. Designações tais como *S. Typhimurium* ou S.I, S. II, S. IIIa, IIIb S., S. IV, S. VI devem ser limitadas a anotações de laboratório, desde que a abreviatura (S.) do gênero (*Salmonella*) não pode ficar sozinha sem ser seguida por um epíteto específico (*S. enterica*). Esta nomenclatura é reconhecida e empregada pelos órgãos internacionais de referência (GUIBOURDENCHE et al., 2010; GRIMONT; WEILL, 2007)

Sorovares de outras subespécies de *S. enterica* e os de *S. bongori* são designados apenas por sua fórmula antigênica, somática e flagelar, designado neste caso por 1^o) o antígeno somático “O”, seguido por dois pontos; 2^o) O antígeno flagelar de fase 1 e o antígeno flagelar de fase 2 (se houver). Exemplo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* O: 45: g, z₅₁:- e. *S. bongori* O: 61: z₃₅:- (GRIMONT; WEILL, 2007).

Em 2004, uma nova espécie foi proposta, *Salmonella subterranea*, isolada em sedimento subterrâneo de solo com baixo pH na Oak Ridge, Tennessee. Essa amostra apresentou forte inter-relação com *S. bongori*, por meio de sequenciamento 16S rRNA, além de algumas características metabólicas, como indol positivo, H₂S e lisina descarboxilase negativa, pigmento amarelo e um flagelo lateral. A amostra-tipo proposta é ATCC BAA-86 (SHELOBOLINA et al., 2005). No entanto, mais recentemente, o Centro de Colaboração à OMS para Referência e Pesquisa em *Salmonella* (WHOCC-Salm) não reconhece essa bactéria como pertencente ao gênero (GRIMONT; WEILL, 2007).

A diferenciação fenotípica das espécies e subespécies de *Salmonella* está representada no Quadro 2.

Quadro 2 - Caracterização fenotípica das espécies e subespécies de *Salmonella* spp.

Espécies	<i>Salmonella enterica</i> subsp.						<i>S. bongori</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>	
Subespécies							
Características							
Dulcitol			-	-	-	d	+
ONPG (2h)			+	+	-	d	+
Malonato			+	+	-	-	-
Gelatinase			+	+	+	-	+
Sorbitol			+	+	+	-	+
Crescimento KCN			-	-	+	-	+
L(+) Tartarato ^(a)			-	-	-	-	-
Galacturonato			-	+	+	+	+
γ -glutamyl transferase	(^b)		+	+	+	+	+
β -glucuronidase			-	+	-	d	-
Mucato			+	- (70%)	-	+	+
Salicina			-	-	+	-	-
Lactose			-(75%)	+(75%)	-	d	-
Lise-fago O ₁			-	+	-	+	D
Habitat	Animais de sangue quente		Animais de Sangue frio e meio ambiente				

Notas: (a): d-tartarato; (b): *Salmonella* ser. Typhimurium (d), *Salmonella* ser. Dublin (-);
 +: $\geq 90\%$ reações positivas;
 -: $\geq 90\%$ reações negativas; d: diferentes reações (sorovares); (e): crescimento sem produção de ácido. (Adaptado de Grimont; Weill, 2007)

2.1.2. Características clínicas

A salmonelose é uma doença que ocorre mundialmente, verificando-se um aumento no número de registros de casos nos últimos anos (CDC, 2011), principalmente a partir da década de 80.

A transmissão geralmente ocorre através da ingestão de alimentos contaminados. A dose infectante varia de 10^5 a 10^8 células, porém em pacientes imunocomprometidos têm sido observadas doses $\leq 10^3$ células para alguns sorovares envolvidos em surtos de doenças de transmissão alimentar (DTA). Particularmente em alimentos com elevado teor lipídico, como ovos e chocolate, as salmonelas ficam protegidas dentro dos glóbulos de gordura, não sendo afetadas pelas enzimas digestivas ou pela acidez gástrica, reduzindo sua dose infectante (FORSYTHE, 2002).

No homem, as manifestações clínicas incluem quadros entéricos agudos ou crônicos, além de localização extra intestinal, como infecções septicêmicas, osteomielite, artrite, hepatite, etc. A patogenicidade varia de acordo com o tipo sorológico e características do indivíduo. A *Salmonella* ser. Typhi causa uma doença chamada febre tifóide, que apresenta sintomas como febre, diarreia, dor de cabeça e cólica abdominal, podendo evoluir para complicações neurológicas, esplênicas, hepáticas e respiratórias. A *Salmonella* ser. Paratyphi (A, B e C) causa enfermidade similar à febre tifóide (SALYERS & WHITT, 1994).

Os outros sorovares de *Salmonella*, designados “não tifóides” são reconhecidos por causar um quadro gastroentérico autolimitante. Os principais sintomas são náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia, apresentando um período de incubação entre 12 e 36 horas, podendo em alguns casos ser mais curto, porém em determinadas circunstâncias, como indivíduos jovens ou aqueles portadores de alguns tipos de patologias, pode determinar infecção septicêmica ou localizações extraintestinais graves como por exemplo, meningite ocasionada por *Salmonella* ser.Typhimurium em crianças em São Paulo (RODRIGUES, 2001), artrite séptica em neonato na Índia também pelo sorovar Typhimurium (SARGUNA; LAKSHMI, 2005) e *Salmonella* ser.Infantis e *Salmonella* ser.Agona envolvidos em infecções graves em crianças (FONSECA et al., 2006).

Os microorganismos penetram por via oral e a ocorrência da doença entérica se dá com a colonização do intestino delgado distal e início do cólon e disseminação para a submucosa, resultando em enterocolite aguda. Normalmente o quadro diarreico é moderado, sem a presença de sangue, entretanto, em alguns quadros clínicos, pode ocorrer perda de pequeno volume de fezes associado a tenesmo e sangue.

Sob o ponto de vista veterinário, a salmonelose é uma doença bacteriana que afeta todas as espécies animais, mas, com maior frequência, bovinos, eqüinos e suínos podendo se manifestar sob a forma de septicemia, enterite aguda ou crônica ou infecções localizadas extraintestinais.

Sorovares altamente adaptados à espécie são agentes do Paratifo enquanto animais infectados por salmonelas paratíficas podem desenvolver a doença clinicamente ou de forma assintomática, albergar esses agentes, tornando-se fonte em potencial de salmonelose para seres humanos.

Particularmente nas aves, as infecções por salmonela são responsáveis por uma variedade de doenças agudas e crônicas destacando-se a pulrose, causada por *Salmonella* ser Pullorum, o tifo aviário, por *Salmonella* ser Gallinarum e infecções paratíficas, por um grande número de sorovares os quais são de maior interesse em saúde pública animal e humana por seu freqüente isolamento em produtos de origem animal. Estes sorovares, capazes de determinar patologias específicas para as aves, quase impossibilitaram a produção avícola em larga escala, antes do desenvolvimento de testes práticos e programas de erradicação (CARDOSO; TESSARI, 2008; HOFER et al., 1997).

2.1.3. Patogenicidade

A estratégia patogênica de *S. enterica* inclui a penetração na barreira intestinal e a interação com células do sistema imune onde atua como parasita intracelular. Em consequência, os mecanismos de virulência de *S. enterica* são complexos (MARCUS et al., 2000).

Podemos distinguir dois grupos de fatores de virulência. As estruturas superficiais da bactéria que são o lipopolissacarídeo (LPS), com atividade tóxica, devido ao lipídeo A; os flagelos que locomovem a bactéria para o epitélio intestinal, mediante quimiotaxia, permitindo atravessar a espessa capa de mucina e contribuindo para o processo inflamatório; a cápsula, diretamente relacionada com a capacidade invasiva do sorovar Typhi e as fimbrias. No outro grupo estão incluídos os genes de virulência, localizados nas Ilhas de Patogenicidade - SPI, no cromossoma ou em plasmídeos, que codificam fatores solúveis que modificam a fisiologia celular do hospedeiro ou protegem a bactéria dos sistemas antimicrobianos do mesmo. Estes genes podem estar livres, formando pequenos grupos ou em agrupamentos maiores, chamados “Ilhas de Patogenicidade (PI)” (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

Salmonella tem vários tipos de fimbrias ou “pili” que são estruturas de superfície de

natureza proteica consideradas como adesinas, por facilitar a união da bactéria a receptores específicos das células do hospedeiro. Entre estas estão as fímbrias do tipo I (Fim), fímbrias codificadas por plasmídeos (*Plasmid Encoded Fimbriae* – PEF), fímbria polar longa (*Long Polar Fimbriae* – LPF) e fímbrias agregativas (*Aggregative fimbriae* – AGF) que estão presentes na maioria dos sorotipos (WEENING et al., 2005; HUMPHRIES et al., 2003). Nem todas essas fímbrias estão associadas exclusivamente com a virulência da bactéria já que cepas não patogênicas podem conter um ou mais tipos de fímbrias.

A maioria dos fatores de virulência de *Salmonella* está codificada em genes agrupados em ilhas de patogenicidade (VIEIRA, 2009).

A interação inicial entre a bactéria e as células epiteliais do hospedeiro não é muito conhecida, mas sabe-se que neste processo estão envolvidos o Sistema de Secreção do Tipo III (*Type III Secretion System* – TTSS) e as Ilhas de Patogenicidade (BARROW et al., 2010).

As Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI) se definem como grandes agrupamentos de genes dentro do cromossoma bacteriano, que codificam para determinantes responsáveis por estabelecer as interações específicas com o hospedeiro e que são necessárias para a expressão de virulência bacteriana em um modelo animal. Geralmente apresentam um conteúdo em Guanina e Citosina (GC) menor que o resto do cromossoma bacteriano e estão freqüentemente inseridas dentro de genes que codificam tRNA. Isto poderia indicar que possam ser adquiridas por transferência horizontal a partir de fagos ou plasmídeos e permite que rapidamente algumas espécies adquiram as funções de virulência de outras. No caso de algumas SPIs altamente instáveis, tem sido detectadas seqüências associadas a elementos genéticos móveis como integrons, transposons, repetições diretas ou genes fágicos (HENSEL, 2004).

Já foram descritas vinte três diferentes ilhas em *Salmonella* spp.; algumas delas são conservadas entre os diferentes sorovares indicando que foram adquiridas há muitos anos, como SPI-1. Outras ilhas são específicas de determinados sorovares e, provavelmente, adquiridas recentemente como SPI-7, SPI-8 e SPI-15 (HENSEL, 2004; BARROW et al., 2010). As ilhas melhor descritas e estudadas são SPI-1 e SPI-2.

Aparentemente, ambas as SPIs foram adquiridas por transferência horizontal de genes, pois as concentrações das bases nitrogenadas (GC) nestas ilhas são diferentes da concentração normalmente encontrada nos genes típicos de *Salmonella* spp. As ilhas 1 e 2 são as mais importantes para a virulência de *Salmonella* ser Enteritidis em galinhas, resultando em aumento significativo na colonização do fígado e baço por este sorovar (RYCHLIK et al., 2009).

SPI-1. É necessária para que se produza a infecção intestinal, mediando a invasão de células não fagocíticas por *Salmonella*, inflamação do epitélio e sintomas diarreicos (ZHOU; GALÁN, 2001; MARCUS et al., 2000). Contém pelo menos 29 genes que codificam os componentes estruturais de um Sistema de Secreção do Tipo 3 (SPI-1-T3SS) (*invA*, *invH* e *prgH*), proteínas que formam um poro pelo qual penetram, no citosol da célula eucariótica, proteínas efetoras secretadas pelo T3SS, porém nem todos os efetores são codificados por SPI-1. O *invA*, está localizado no *operon invABCD*. Este gene codifica a proteína InvA da membrana interna da bactéria, sendo essencial para a invasão das células epiteliais do hospedeiro (DARWIN; MILLER, 1999; OLIVEIRA et al., 2003).

Estas moléculas interagem diretamente com os sistemas de sinalização celular, forçando a entrada do patógeno nas células do epitélio intestinal e desencadeando o processo inflamatório na mucosa. Crucial para internalização é a polimerização do citoesqueleto de actina no sitio de contacto com a bactéria, que culmina com a formação de projeções (“ruffles”) na membrana da célula hospedeira. Estes prolongamentos englobam a bactéria e depois a internalizam. Para completar a entrada e reparar o citoesqueleto das células epiteliais, *Salmonella* inicia a despolimerização da actina localizando-se no interior das células

hospedeiras, dentro de vesículas membranosas denominadas vacúolos que contêm *Salmonella* “SVC”(Salmonella-Containing Vacuole) (SANSONETTI, 2002).

SPI-2. Relaciona-se com a capacidade de sobreviver no interior dos macrófagos e de multiplicar-se dentro de SVCs em fagócitos e outras células eucarióticas, por isso, é essencial na infecção sistêmica (SCHMIDT; HENSEL, 2004). Esta ilha constitui um excelente exemplo de complexidade e eficácia na adaptação de um patógeno a um determinado ambiente, neste caso, o interior de células hospedeiras. Está presente tanto em *S. enterica* como em *S. bongori* (MARCUS et al., 2000; HENSEL, 2004). SPI-2-SST3 atua no interior de células eucarióticas, translocando proteínas efetoras através da membrana das SVCs (WATERMAN; HOLDEN, 2003; ABRAHAMS; HENSEL, 2006).

SPI-3. A principal função da virulência desta ilha é codificada pelo operon *mgtCB*, um sistema de alta afinidade por Mg^{2+} , envolvido na adaptação às limitações nutricionais do habitat intrafagossômico (SCHMIDT; HENSEL, 2004).

SPI-4. É necessária para a sobrevivência de *Salmonella* spp. dentro dos macrófagos e também possui o Sistema de Secreção do Tipo I (SST1) que media a secreção de toxinas (HANSEL, 2004). Como *Salmonella* ser. Typhimurium é capaz de induzir apoptose dos macrófagos infectados, postula-se que SPI-4 estaria envolvida na secreção de uma citotoxina (MARCUS et al., 2000.; SCHMIDT; HENSEL, 2004).

SPI-5. Contém informações para proteínas efetoras que são translocadas pelos dois SST3 envolvidos na virulência de *Salmonella* (HENSEL, 2004).

SPI-6 ou Ilha Cromossomal de *Salmonella* spp. Está presente nos sorovares *S. Typhi* e *S. Typhimurium*. Nesta IP estão localizados os genes *saf*, codificador de fímbrias, e *pagN*, codificador de uma invasina, e de proteínas sem função conhecida. Esta IP não está relacionada com a infecção sistêmica, mas possui influência na capacidade de invasão da bactéria (HENSEL, 2004).

SPI-7 ou Ilha Maior de Patogenicidade. É específica dos sorovares Typhi, Paratyphi C e Dublin. Contém diferentes genes de virulência que codificam o polissacarídeo capsular Vi, uma proteína efetora SopE (rearranjo da actina e *ruffling*) e quatro tipos de fímbrias associados com invasão de células epiteliais pelo sorotipo Typhi (HANSEL, 2004; BARROW et al., 2010).

A SPI-8. Parece estar restrita a *Salmonella* ser. Typhi. Ainda não se sabe exatamente qual é sua função. A SPI-9 contém genes para o SST3, sendo descrito principalmente em *Salmonella* ser. Typhi e *Salmonella* ser. Typhimurium. A SPI-10 está relacionada com o operon *sef* para fímbrias. Está presente somente em *Salmonella* ser. Enteritidis e outros do grupo D1, sendo considerado um dos fatores determinantes da especificidade do hospedeiro (HANSEL, 2004). A SPI-11 está relacionada com as proteínas efetoras do SST3. SPI-12, SPI-14 e SPI-15 são responsáveis pela produção de proteínas sem função conhecida. A SPI-13 está relacionada com a sobrevivência de *Salmonella* spp. no interior dos macrófagos. SPI-16 e SPI-17 estão relacionadas com genes de modificação do LPS (BARROW et al., 2010). Além destas IPs, outras duas ilhas foram descritas: Ilha Genômica 1 de *Salmonella* (*Salmonella Genomic Island 1 - SGI-1*) e a Ilha de Alta Patogenicidade (*HPI-High Pathogenicity Island*) (KARASOVA et al., 2010; HANSEL, 2004). A SGI-1 está relacionada com a resistência a antimicrobianos, enquanto que a HPI parece estar relacionada com a habilidade de algumas cepas provocarem septicemia (HANSEL, 2004) e captação de ferro (BARROW et al., 2010).

2.1.4. Ecologia

O habitat natural das salmonelas é o trato intestinal do homem e outros animais, sendo eliminada em grande número nas fezes, contaminando o solo e a água (BRASIL, 2011).

Em comparação com outros bastonetes Gram negativos, possuem mecanismos de

adaptação a condições ambientais adversas, sendo resistentes à dessecação e ao congelamento podendo sobreviver no ambiente por anos, em particular na matéria orgânica. (GRIFFITH et al., 2006).

Pode permanecer viável no material fecal por longo período (anos), particularmente em fezes secas, podendo resistir mais de 28 meses nas fezes de aves, 30 meses no estrume bovino, 280 dias no solo cultivado e 120 dias na pastagem, sendo ainda encontrada em efluentes de água de esgoto, como resultado de contaminação fecal. São sensíveis à luz solar e a desinfetantes como fenóis, clorados, quartenário de amônio e iodados (BOROWSKY et al., 2006).

A adaptabilidade fisiológica de *Salmonella* é demonstrada por sua habilidade para proliferar em valores de pH entre 6,5 e 7,5 (extremos 4,0 e 9,0). A maioria dos sorovares cresce em temperatura variando de 5 a 47°C, com temperatura ótima de 35 a 37°C mas alguns podem crescer em temperaturas tão baixas quanto 2 a 4°C ou a 54°C (GRAY; FEDORKA-CRAY, 2002). A bactéria é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura igual superior a 70°C. No entanto, a termorresistência pode incrementar-se com menor coeficiente de atividade de água. Requerem alta atividade de água (a_w) entre 0,99 e 0,94 e pode sobreviver em atividade de água <0,2 quando em alimentos secos. Completa inibição do crescimento ocorre à temperatura <7°C, pH <3,8 ou atividade de água <0,94 (BHUNIA, 2008; HANES, 2003)

Nos produtos secos, como o chocolate, o cacau em pó, as especiarias ou o leite em pó, e em produtos congelados, como os sorvetes, o normal é a sobrevivência por períodos de tempo prolongados (BRASIL, 2011; FORSYTHE, 2002).

A inativação ocorre rapidamente em temperatura de pasteurização em alimentos com atividade de água $\geq 0,95$ a qual, quando inferior, aumenta a termorresistência. Essa associação entre tolerância ao sal e ácido resistência são interdependentes. Certos processos como salmoura ($\geq 9,0\%$) e defumação têm efeito limitado na sobrevivência das salmonelas, pois elas podem sobreviver por vários meses na salmoura com cerca de 20% de sal e em produtos de elevados teores protéicos ou de gordura. Como exemplos, podem ser citados a carne seca defumada e o pescado, nos quais as salmonelas apresentam capacidade de sobrevivência de várias semanas a meses. A relativa resistência que esses microrganismos apresentam à dessecação, congelamento, salmoura e defumação explica por que sobrevivem em muitas classes de alimentos (FORSYTHE, 2002).

O efeito bactericida das condições ácidas varia de acordo com a natureza do ácido utilizado no processo, sendo que os ácidos acético e propiônico são mais inibitórios que os ácidos láctico e cítrico (BRASIL, 2011; AL-TARAZI; ALSHAWABKEH, 2003; SILVA et al. 2001)

2.1.5. Epidemiologia

As primeiras salmonelas foram descobertas no século passado. William Budd (1856) descreveu a Febre Tifóide acreditando que o agente causal era excretado pela urina e fezes e que o leite e a água eram importantes veículos de infecção. Em 1880, Eberth observou o bacilo tífico em órgãos de vítimas da Febre Tifóide e, em 1884, Gaffky, isolou o germe em cultura pura (Apud BIER, 1985).

Posteriormente, Salmon e Smith (1885) isolaram o *Bacillus cholerae suis*, e por algum tempo acreditou-se ser o agente causal da Peste Suína, quando em 1903, Schweintz e Dorset atribuíram a um vírus filtrável a etiologia da doença, considerando a *Salmonella*, um invasor secundário. Em 1888, na Alemanha, GARTNER identificou uma *Salmonella* não tifóide, *Bacillus enteritidis*, atualmente *Salmonella* ser. Typhimurium em um surto de gastroenterite no homem tendo como veículo a carne bovina crua (Apud BIER, 1985).

Desde então, numerosos outros sorovares foram isolados de fonte humana, animal e do ambiente. Paralelamente, e acompanhando a evolução econômica, industrial e social da humanidade, as infecções causadas por algumas salmonelas foram caindo de frequência, enquanto as causadas por outras, foram aumentando.

Um exemplo de infecção salmonelósica que teve sua incidência reduzida com o progresso da humanidade é a Febre Tifóide, cujo agente, a *Salmonella* ser. Typhi tem como hospedeiro exclusivo o homem. O inverso é encontrado nas infecções causadas por várias outras salmonelas, como a *Salmonella* ser. Typhimurium, que geralmente não estão adaptadas a um determinado tipo de hospedeiro (TRABULSI; PASTERNAK, 1981).

Como abordagem desta evolução histórica, salienta-se que o ano de 1888 marcou o centenário da identificação de salmonela não tifóide como um patógeno humano. Um surto na Alemanha afetou 58 pessoas que consumiram carne bovina moída crua e um microrganismo, depois conhecido com *Salmonella* ser. Typhimurium foi isolado do sangue e do baço de uma vítima fatal (KARLINSKI, 1889).

A partir daí a epidemiologia da infecção por *Salmonella* pode então ser dividida em 3 períodos (TAUXE, 1991):

Durante o primeiro período, do final dos anos de 1800 a 1949, a Febre Tifóide causada por *Salmonella* ser. Typhi, era a infecção predominante no homem nos Estados Unidos. Nos animais destacaram-se a *Salmonella* Choleraesuis, importante patógeno de suíno, *S. Bovismorbificans*, causa de infecção em bovinos e *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*, reconhecidas como os maiores patógenos em aves domésticas (pintos).

No segundo período (1950 – 1969) estas graves infecções determinadas por salmonelas específicas do hospedeiro, tornaram-se relativamente raras. Febre Tifóide foi praticamente eliminada em vários países industrializados, em decorrência das medidas de saneamento instituídas. Na população animal, várias infecções por *Salmonella* foram controladas com medidas higiênicas aplicadas nas áreas de criação.

Ao mesmo tempo, outros sorovares de *Salmonella* não tifóides, eram identificados e reportados, mais freqüentemente, como causa de gastroenterite no homem. O segundo período foi marcado por baixos níveis de transmissão de sorovares espécie-específicos e um modesto nível de transmissão de salmonelas não tifóides para o homem, provavelmente por uma variedade de reservatórios. A doença clínica típica produzida por salmonelas no homem xcmudou de febre tifóide, uma infecção sistêmica, bacteriêmica, para gastroenterite, marcada por diarreia, febre e dor abdominal, com rara invasão.

O 3^o período (1970 em diante) tem sido caracterizado por um constante aumento de notificações de salmonelose humana não tifóide. Alimentos de origem animal são atualmente incriminados como a causa da grande maioria das infecções por salmonelas no homem.

Se a relativa raridade da infecção por salmonela nos anos de 1950 a 1960 foi resultado da moderna medicina preventiva humana e veterinária, o atual quadro epidemiológico da salmonelose é um PARADOXO PÓS-MODERNO: onde um grande número de seres humanos tornam-se doentes após consumirem alimentos produzidos a partir de animais aparentemente sadios colonizados com salmonelas. Uma variedade de sorovares freqüentemente resistente a antimicrobianos tem se tornado comum entre animais fontes de alimentos, posto que eles raramente causam doença nos animais. Este novo paradigma epidemiológico é também verdadeiro para outros importantes patógenos emergentes, de origem alimentar (TAUXE, 1991), tais como, *Campylobacter* (cujos reservatórios são as aves sadias), *E.coli* O157:H7 (bovinos-carne) e *Vibrio vulnificus* (pescado).

Com base na especificidade com o hospede e padrão clínico por eles determinado, os sorovares de *Salmonella* podem ser divididos em 3 categorias. Aqueles altamente adaptados ao homem incluindo os sorovares *S. Typhi*, e *S. Paratyphi* A e C e *S. Sendai* que causam grave doença como as febres, tifóide e paratifóide, não sendo patogênicos para os animais. Um

segundo grupo, representado por salmonelas altamente adaptadas aos animais tais como, *Salmonella* ser. Dublin (bovinos), *Salmonella* ser. Choleraesuis (suínos), *Salmonella* ser. Typhisuis (suínos), *Salmonella* ser. Pullorum e *Salmonella* ser. Gallinarum (aves), responsáveis pelo Paratifo dos animais porém, em determinadas situações (idade jovem, pacientes com doença crônica, idosos, imunocomprometidos), os sorovares *Salmonella* ser. Dublin e *Salmonella* ser. Choleraesuis podem determinar no homem um quadro septicêmico, i.é., mais grave do que o causado por *Salmonella* ser. Typhi. A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e animais, "salmonelas zoonóticas". São responsáveis por quadro de gastroenterite (enterocolite) ou infecções alimentares no homem. Entre estas, alguns sorovares tem seu potencial patogênico reconhecido, como *Salmonella* ser Typhimurium, que além do quadro gastroentérico pode determinar infecção septicêmica em animais jovens e no homem, assim como *Salmonella* ser Infantis e *Salmonella* ser Agona reconhecidas por determinar infecções graves em crianças (BOYEN et al., 2008; FONSECA et al., 2006; GRAY; FEDORKA-CRAY, 2002).

Milan et al. (2004) ressaltam a importância de mamíferos e aves selvagens como reservatórios de *Salmonella*, sendo um risco de contaminação para o homem e animais de produção.

Atualmente são as "salmonelas paratíficas" que ameaçam a aceitação pública dos produtos de origem animal. Considerando que sua principal via de transmissão está na cadeia alimentar, sua presença em animais criados com objetivo comercial, aponta este microrganismo como o mais incidente e relevante agente etiológico de enteroinfecções, incriminado como um dos principais responsáveis por surtos de doenças transmitidas por alimentos (ALVES et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2000). Isto resulta em milhões de dólares em perdas para a indústria, particularmente de bovinos, suínos e aves, tanto para o mercado interno quanto para exportação, onde em alguns países, a rigidez na inspeção representa uma necessidade constante de qualidade (HUMPHREY, 2000; JAY, 2005).

Deste modo, produtos de origem animal são os maiores responsáveis pela distribuição mundial das salmonelas representados principalmente pela carne de frango e ovos, os quais são consumidos por todas as classes sociais, e portanto considerados veiculadores de numerosos sorovares envolvidos em infecções no homem (JAY, 2005; HUMPHREY, 2000).

Nas aves as infecções determinadas por estes microrganismos são comumente associadas a um sistema de criação intensiva, atingindo aves jovens (até duas semanas de idade), sendo os adultos portadores assintomáticos por longo período (HOFER et al., 1997). Embora todas as salmonelas possam ser reconhecidas como um patógeno potencial, algumas estão presentes no intestino de aves saudáveis, sendo capazes de contaminar o meio ambiente e outras aves, através das fezes (POPPE, 2000).

Por outro lado, quase todos os plantéis de aves podem estar contaminados devido às características zoonóticas do microrganismo com a necessidade de extensa atividade de controle por parte dos responsáveis pela sua produção. O número de bactérias pode ser baixo em princípio, porém a contaminação dos produtos pode ocorrer além da cadeia produtiva, durante o transporte, processamento, embalagem, estocagem, distribuição e preparo para o consumo, aumentando substancialmente o risco de infecção (LOGUE et al., 2003; WHO, 2002).

Por séculos o consumo de ovos sem cocção era uma prática comum do homem, porém na atualidade o reconhecimento, a partir de diferentes surtos, determinados pelo sorovar *S. Enteritidis* e mais recentemente por outros sorovares (*S. Heidelberg*, *S. Agona* e *S. Virchow*) levaram ao reconhecimento de sua capacidade de transmissão transovariana (vertical), levando a disseminação para o homem através de alimentos onde são utilizados sem a devida cocção, como tortas, maioneses, omeletes, etc (WHITE et al., 2006).

A transmissão horizontal envolve todos os sorovares, os quais apresentam

características ubíquas. Esta pode ocorrer por contaminação fecal da casca do ovo, durante a postura, ou em ninhos, camas e incubadoras infectadas, nas quais a matéria prima e as rações representam importantes veículos de disseminação entre os animais, salientando-se o papel de roedores como portadores assintomáticos, por longos períodos (>10 meses) disseminando tais microrganismos entre diferentes áreas. Embora, na literatura nacional, durante o século XX entre as décadas de 80 e 90, seja apontada ausência dos sorovares adaptados às aves em rações ou suas matérias primas de origem animal, algumas medidas têm sido adotadas pelos criadores, no sentido de minimizar possíveis contaminações, tendo em vista a impossibilidade de sua eliminação total (BACK et al., 2006; CDC, 2006; FAO, 2006; TESSARI et al., 2003; HUMPHREY, 2000).

Na epidemiologia da doença humana há predomínio de somente poucos sorovares, onde alguns se mantêm em estágio contínuo (*Salmonella* ser. Typhimurium), outros se apresentando como emergentes como *Salmonella* ser. Hadar, *Salmonella* ser. Heidelberg, *Salmonella* ser. Infantis e *Salmonella* ser. Enteritidis (FONSECA et al, 2006; VELGE et al., 2005). Surtos de salmonelose humana ocasionados por *Salmonella* ser. Enteritidis têm aumentado dramaticamente sendo de grande importância em Saúde Pública e de ordem econômica (KOTTWITZ et al., 2010; SANTOS et al., 2002). Neste contexto, aponta-se *Salmonella* ser. Enteritidis fagotipo 4, destacando-se como agente de infecção alimentar, particularmente na Europa e Estados Unidos, tendo em vista suas características pandêmicas. Em 2004, aproximadamente 60% dos casos humanos reportados pelo Center for Diseases Control and Prevention (CDC, 2005 b) eram determinados por quatro sorovares: *Salmonella* ser. Typhimurium (22,1%), *Salmonella* ser. Enteritidis (17,7%), *Salmonella* ser. Newport (10,0%) e *Salmonella* ser. Heidelberg (5,9%). Esta ocorrência era mais pronunciada na França onde mais de 70% dos casos envolviam: *Salmonella* ser. Enteritidis (33,0%), *Salmonella* ser. Typhimurium (32,0%) e *Salmonella* ser. Hadar (6,0%).

No Brasil, estes sorovares encontram-se entre os mais frequentes nas duas últimas décadas (HOFER et al., 1997, 1998; RODRIGUES, 2010). Relatórios anuais do Laboratório de Referência Nacional/IOC/FIOCRUZ encaminhados a CGLAB/SVS/MS (RODRIGUES, 2011) vêm apontando ao longo dos últimos cinco anos, que na média anual de 16000 cepas recebidas, *Salmonella* ser. Enteritidis representa o sorovar mais prevalente, seguido de *Salmonella* ser. Typhimurium, *Salmonella* ser. Minnesota, *Salmonella* ser. Mbandaka, *Salmonella* ser. Senftenberg e *Salmonella* ser. Agona, em isolados de fontes humana, alimentar, ambiental, animal e matérias primas/rações.

Dois grandes mudanças, na epidemiologia das salmoneloses não tifóides na Europa e Estados Unidos, ocorreram na segunda metade do século XX: o aumento de sua casuística e emergência de infecções humanas de origem alimentar determinadas por *Salmonella* ser. Enteritidis e multirresistência aos antimicrobianos em *Salmonella* ser. Typhimurium (O'BRIEN, 2002).

2.2. *Salmonella* spp. em Alimentos

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexa em sua epidemiologia e controle, cujos padrões diferem de uma região para outra. Isto se deve a diferenças nos hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos, criação de animais e padrões de higiene e saneamento. Seu controle é um trabalho árduo, tendo em vista a emergência de novos sorovares e a reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto naqueles industrializados (OMS, 1988).

Salmonelas são amplamente distribuídas na natureza e sobrevivem bem em uma variedade de alimentos, sendo as aves, ovos e produtos lácteos os veículos mais comuns. Nos últimos anos produtos frescos como frutas e legumes vem ganhando importância como

veículos de transmissão, e a contaminação pode ocorrer em várias etapas ao longo da cadeia alimentar (BOUCHRIF et al. 2009 a,b).

O ambiente contaminado com *Salmonella* constitui-se uma importante fonte de infecção porque este microrganismo pode sobreviver no ambiente por longo período. *Salmonella* pode ser transmitida a vetores como ratos, moscas e aves, os quais podem disseminar através de suas fezes por semanas ou meses. Por outro lado, os suínos, bovinos e aves funcionam como importantes fatores de risco, contaminando os alimentos. O homem se infecta ao ingerir alimento ou água contaminados por reservatórios animais. Além disso, a infecção ocorre pela ingestão de alimentos contaminados em função da manipulação inadequada por indivíduos infectados (NEWELL et al. 2010).

Qualquer alimento que contém *Salmonella* é um risco potencial para o consumidor, cuja veiculação é facilitada, na atualidade, pela mudança nos hábitos alimentares da população. A necessidade cada vez mais intensa de produção/oferta de alimentos tem como fatores de risco, falhas quanto ao manuseio, transporte muitas vezes em condições inadequadas, aliados à ausência de critérios básicos de higiene e saneamento, os quais favorecem a disseminação (OMS, 1988).

Os produtos agrícolas não processados, como hortaliças, frutas e alimentos de origem animal, como carnes cruas, leite e ovos, são veículos frequentes de salmonelas. A contaminação de origem fecal é geralmente a fonte para os produtos agrícolas, pela exposição à água contaminada; para o leite e ovos, através da exposição direta e para a carne, usualmente durante as operações de abate (OMS, 1988).

A contaminação cruzada é o fator principal no caso de alimentos elaborados como cereais, chocolate, doces, produtos a base de soja, de ovos pasteurizados, leite em pó, ingredientes de rações para animais (farinha de peixe, de penas e de ossos) e condimentos. A contaminação durante a elaboração ou preparo pode resultar do contato direto com alimentos antes de sua cocção ou proveniente do meio ambiente, como no caso de superfícies contaminadas em cozinhas ou indústrias, podendo inclusive evoluir para biofilmes (DANMAP, 2007; WONG et al. 2002; OMS, 1988).

A carne de aves tem se convertido em um alimento amplamente consumido mundialmente e em países emergentes, entre eles o Brasil, representa uma fonte relativamente barata de proteína de boa qualidade, cuja produção de aves em grande escala resulta mais fácil que a de outros animais empregados como alimento.

O progresso da avicultura brasileira vem proporcionando uma maior oferta de matéria-prima para o desenvolvimento de produtos derivados de carne de aves e conseqüentemente, uma crescente necessidade de elaborar avaliações específicas que forneçam dados que permitam um balizamento de medidas de controle microbiológico de qualidade para esses produtos (OLIVEIRA et al., 1999).

Apesar do extraordinário avanço tecnológico nas áreas de genética, nutrição, manejo e a utilização de equipamentos modernos, que permite produtividade animal em níveis elevados, o impacto social e econômico das doenças veiculadas através de alimentos de origem animal é considerável (OMS, 1988). Neste particular, membros do gênero *Salmonella* continuam sendo um grave problema particularmente para a avicultura industrial e, conseqüentemente, para a saúde pública, uma vez que o consumo da carne de frango pela população é cada vez maior (TESSARI et al. 2003).

Embora, o veículo de transmissão de *Salmonella* varie geograficamente, diversos autores relataram a implicação de produtos avícolas em surtos de salmonelose em todo o mundo (FERNANDES et al., 2003; NUNES et al., 2003; PRAT et al., 2001).

Investigação de surtos e casos esporádicos tem indicado que, quando um veículo alimentar é identificado, a fonte mais comum de *Salmonella* ser. Enteritidis são aves e derivados, particularmente no caso de surtos, ovos crus ou mal cozidos (CDC, 2006;

NADVORNY et al. 2004; TAVECCHIO et al.2002).

Dentre as salmonelas paratíficas, *Salmonella* ser. Enteritidis é, atualmente, responsável por significativos prejuízos à avicultura, tendo um caráter de zoonose com conseqüências importantes na saúde pública.

Sugere-se que a emergência deste sorovar tenha resultado das práticas atuais de criação intensiva em avicultura, considerando que os prejuízos causados pelas espécies adaptadas às aves como *Salmonella* ser. Pullorum e *Salmonella* ser. Gallinarum, motivaram iniciativas de controle destes sorovares nos países onde a indústria avícola é importante. Conseqüentemente, a hipótese para a pandemia de *Salmonella* ser. Enteritidis seria o preenchimento do nicho ecológico deixado pelos sorovares Gallinarum e Pullorum (SILVA; DUARTE, 2002; BÄUMLER et al., 2001). A adaptação de *Salmonella* ser. Enteritidis às aves pode estar ainda relacionada a uma maior capacidade de contaminação dos ovos em relação a outras salmonelas paratíficas.

A primeira forte evidência do envolvimento deste sorovar com infecção originada pelo consumo de alimentos preparados com ovos, ocorreu em um grande surto em 1986, nos EUA, envolvendo massa comercial congelada. Esta era recheada com queijo, condimentos e ovos crus. O rastreamento epidemiológico apontou *Salmonella* ser. Enteritidis em amostras oriundas de granjas que forneceram os ovos. Daí para frente, inúmeros estudos vincularam os surtos de salmonelose por *Salmonella* ser. Enteritidis com ovos, consumidos mal cozidos ou sem cocção (GILLESPIE et al. 2005; NADVORNY et al., 2004; PATRICK et al., 2004). Nos Estados Unidos o consumo de produtos agrícolas, especialmente ovos crus ou mal cozidos, é ainda considerado a principal fonte de infecção por este sorovar. Recentemente, o Centers for Disease Control and Prevention associou um surto com cerca de 1469 casos a ovos infectados por *Salmonella* ser. Enteritidis nos estados da Califórnia, Colorado e Minnesota no período de 01 de maio a 31 de agosto de 2010 (CDC, 2010).

No Brasil, a partir de 1993, houve uma explosão da ocorrência de *Salmonella* ser. Enteritidis emergindo nos anos subseqüentes com predominância do PT4, tanto em infecções humanas quanto de fontes não humanas, sendo prevalente em produtos avícolas (RODRIGUES, 2006; NEGRETE, 2005; IRINO et al., 1996; TAVECHIO et al., 1996) Grande parte deles tem sido relacionada com o consumo direto ou de pratos preparados com ovos (NEGRETE, 2005; SANTOS et al., 2003; LIRIO et al. 1998; IRINO et al., 1996; TAUNAY et al. 1996; SILVA, 1995). Entre 1975 e 1992, PT8 foi o lisotipo prevalente (81%) nos isolados de fonte humana e não-humana.

Num extenso estudo de 115 surtos alimentares por *Salmonella* ser. Enteritidis ocorridos na região de Campinas, SP, Simões et al. (2001) mostraram que ovos, seus derivados e pratos, foram os principais responsáveis em 807 pessoas com cinco óbitos, envolvendo a maionese caseira em 57% dos casos, seguido de 15% em cobertura de bolos. De 4.581 amostras de *Salmonella* spp. isoladas no Brasil a partir de fontes não humanas entre 1996 e 2000, 32,7% pertenciam a *Salmonella* ser. Enteritidis (TAVECHIO et al., 2002). Das 669 notificações de doenças transmitidas por alimentos relacionadas ao gênero *Salmonella*, recebidas pelo CEVS/ RS, entre 1997 e 2007, 80,8% foram causadas pelo sorovar *S. Enteritidis* e 3,5% pelo sorovar *S. Typhimurium* (FIGUEIREDO, 2008).

2.3. Importância Econômica e Social da Avicultura Brasileira

2.4. 2.3.1. A carne de frango

A avicultura, hoje em dia, é uma atividade econômica internacionalizada e homogênea, sem fronteiras geográficas de tecnologia. Pode ser considerada um complexo industrial que não deve ser analisado apenas sob o aspecto de produção e distribuição, e sim

através de uma abordagem sistêmica do setor (VIEIRA; DIAS, 2010). A indústria avícola brasileira está fortemente instalada na Região Sul do país e em São Paulo.

A carne de aves, pela fácil digestibilidade, pouca gordura e riqueza em proteínas, define características que recomendam um incentivo direcionado ao estímulo crescente da produção e consumo, aliado ao fato de que seu custo de produção tem se mantido estável e, portanto ao alcance da população de baixa renda (UBABEF, 2011).

O frango brasileiro está presente nas mesas de consumidores de mais de 150 países, sendo o Brasil o maior exportador mundial desde 2004 e o terceiro maior produtor de carne de aves, atrás somente de Estados Unidos e China (UBABEF, 2011). Entre os fatores que levaram o país a conquistar esta posição de destaque estão a qualidade e a sanidade do produto brasileiro (BOARETTO, 2009).

De acordo com a União Brasileira de Avicultura (UBABEF, 2011), as exportações brasileiras de carne de frango atingiram 2,239 milhões de toneladas entre janeiro e julho de 2011, 3,4% maior em relação ao mesmo período do ano passado. Esse saldo representou receita de US\$ 4,669 bilhões nos sete primeiros meses deste ano, 24,3% acima dos US\$ 3,756 bilhões de 2010.

Neste período, o Oriente Médio continuou líder nas importações de frango brasileiro, com volume de 828,2 mil toneladas e receita de US\$ 1,571 bilhão, seguido da Ásia (632,5 mil toneladas e US\$ 1,443 bilhão) e União Europeia (284 mil toneladas e receita de US\$ 839 milhões). A África ficou no quarto posto em importações por volumes, com 263,8 mil toneladas e US\$ 360,6 milhões. Já as exportações para os países das Américas, o quinto maior volume registrado, representaram 154 mil toneladas, com US\$ 289 milhões. Por fim, as exportações para a Europa extra-UE representaram 73,5 mil toneladas e US\$ 159 milhões (UBABEF, 2011).

Do ponto de vista social no Brasil, a avicultura emprega mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O setor é representado por dezenas de milhares de produtores integrados, centenas de empresas beneficiadoras e dezenas de empresas exportadoras (BRAZILIAN CHICKEN, 2011).

A importância social da avicultura no Brasil se verifica também pela presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste. Em muitas cidades a produção de frangos é a principal atividade econômica.

2.4.2. Produção de ovos

Outra atividade importante do setor avícola refere-se a produção e consumo de ovos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, no 1º trimestre de 2011 foram produzidas 610,803 milhões de dúzias de ovos de galinha. Houve aumento de 1,2% na produção com relação ao 4º trimestre de 2010, e queda de 1,7% em relação ao 1º trimestre de 2010. A Região Sudeste mantém 47,3% de toda a produção nacional de ovos de galinha. A produção desta região concentra-se em São Paulo que representa 29,2% e em Minas Gerais, 10,7% do total (IBGE, 2011). Com o fortalecimento desse mercado nacional, em 2010 o consumo brasileiro chegou a 20 bilhões de ovos (GLOBO RURAL, 2011).

De acordo com os dados da Secretaria de Comércio Exterior (Secex), órgão do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC), as exportações brasileiras de ovos atingiram 27,4 mil caixas de 30 dúzias em agosto de 2011. O resultado é 27,6% menor na comparação com o mesmo mês de 2010. No acumulado dos últimos 12 meses, o volume exportado também caiu e alcançou 722,2 mil caixas de 30 dúzias. Queda de 51,7% em relação a igual período anterior, segundo a Secex (NOTÍCIAS UNIFRANGO, 2011).

No âmbito mundial, os números da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação revelam que em 10 anos – de 1999 para 2009 – a produção mundial de ovos de galinha aumentou pouco mais de 25%. Entre os 10 maiores produtores a expansão foi de 26,5%, registrando-se expansão acima da média na Indonésia (que subiu da 16ª posição para o 8º lugar), Ucrânia (do 18º para o 10º). O Brasil ocupa o sétimo lugar na produção mundial de ovos, sendo liderado pela China, seguido de EUA, Índia, Japão, México, Rússia (AVESITE, 2011).

2.3.3. Ovo: estrutura e função

Gallus domesticus é a ave mundialmente usada para produção de ovos sendo um dos alimentos consumidos em todo o mundo e tendo importância muito grande no contexto alimentar sendo uma fonte equilibrada de nutrientes na dieta humana de várias faixas etárias, especialmente crianças, jovens e idosos. É rico em proteínas de mais alta qualidade, sendo considerada “*gold standard*”, quando comparada a qualidade de outras proteínas em alimentos tais como o leite, carne e peixe, superado apenas pelo leite materno. Um ovo fornece também ácidos graxos insaturados, ferro, fósforo, várias vitaminas (A e B12), além de ácido fólico, tiamina, riboflavina e os minerais fósforo e zinco (LI-CHAN et al., 1995).

O ovo é uma estrutura complexa (Figura 1) que possui três partes principais: a gema, o albúmen e a casca. Possui também outras estruturas em menor proporção, entre elas, o blastodisco, a calaza, a câmara de ar, a cutícula e as membranas da casca (ROSE, 1997). A casca representa 8 a 11% do peso do ovo, a clara ou albúmen, 56 a 61% e a gema, 27 a 32%. A forma da casca e o peso de ovos de galinha dependem da hereditariedade, idade, estação do ano e dieta (ORDÓNEZ, 2005).

A casca é constituída por uma armação de substância orgânica (escleroproteína e colágeno) e minerais (carbonato de cálcio e magnésio). A casca do ovo possui pequenos poros para a troca de gases. Estes poros estão cobertos por uma cutícula composta de cera que protege o ovo contra perda de água e dificulta a penetração de microorganismo (MILES, 2000; PRODLOVE, 1996).

Na superfície interna da casca estão localizadas duas membranas, denominadas membranas da casca. Estas estão situadas entre o albúmen e a superfície interna da casca. A membrana externa, também chamada “esponjosa” mais espessa e próxima à casca, e outra mais fina (interna), também chamada “mamilaria”. Ambas são formadas por fibras protéicas entrecruzadas. As membranas da casca estão em estreito contato, exceto na extremidade mais ampla do ovo onde se separam para a formação da câmara de ar (BURLEY; VADEHRA, 1990; STADELMAN; COTTERILL, 1977).

Albúme

O albúmen circunda a gema e possui a função de absorver impacto, assim como é uma fonte de nutrientes. É composto de três camadas: uma fina camada externa (23%), uma camada grossa (57%) e a uma fina camada interna (20%). Contém de 85 a 90% de água, sendo a proteína o outro componente principal, estando a ovomucina presente em 54% do conteúdo total. Estão ainda presentes a ovalbumina, conalbumina, ovomucoide, lisozima, globulina e avidina. Há somente cerca de 1% de carboidratos no albúmen e o conteúdo de lipídios é de 0,1 a 0,2%, o que resulta em baixo valor calórico (ORDÓNEZ, 2005; SOUZA-SOARES; SIEWERDT, 2005).

Gema

A gema que é envolta pela membrana vitelina, possui de cada lado duas calazas, firmemente aderidas à sua superfície de um lado e entrelaçadas com fibras no albúmen, do outro lado, cuja função é estabilizar a posição daquela próxima ao centro geométrico do ovo. O blastodisco é um pequeno disco que contém o código genético do ovo, situado na superfície da gema (SOUZA-SOARES; SIEWERDT, 2005; ROSE, 1997).

A gema consiste de uma solução de partículas em uma suspensão de proteínas. São várias as proteínas presentes na gema. A vitelina complexa-se a lipídios para formar lipovitelina, e a fosvitina é uma fosfoproteína não lipídica. A gema é constituída de aproximadamente 65,5% de triglicerídeos, 28,3% de fosfolipídios e 5,2% de colesterol (ORDÓNEZ, 2005; SOUZA-SOARES; SIEWERDT, 2005).

Uma pequena parte dos carboidratos é formada de glicose em estado livre; estes e as cinzas podem chegar a 1%, sendo os principais elementos o fósforo, o cálcio e o potássio (MADRID et al., 1996). A coloração amarelada da gema é devida, principalmente, à presença de carotenóides.

As calazas, duas estruturas esbranquiçadas e enroladas, de natureza fibrosa, se estendem através da clara até as extremidades do ovo, de forma contínua e com uma camada calazífera encobrendo a gema, sustentando-a em sua posição, no centro do ovo (BEIG e GARCIA, 1987).

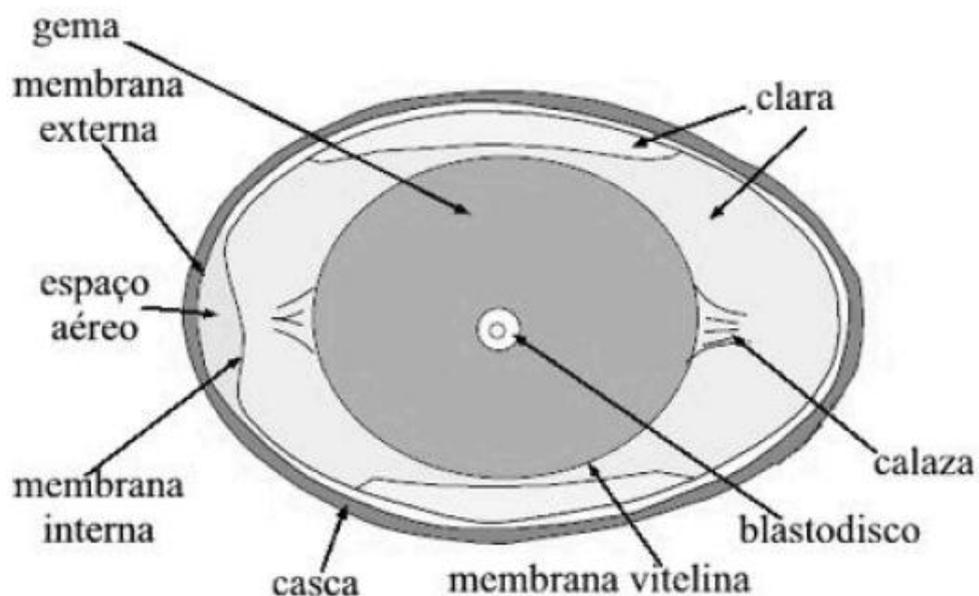


Figura 1. Diagrama de um ovo.

(Fonte: Aves e Ovos

<http://curlygirl.naturlink.pt/ovoave.jpg>)

2.4. *Salmonella* em Ovos

Entre os produtos de origem animal, os ovos são os mais associados com surtos por *Salmonella*. Seu consumo por vezes se encontra diminuído em função de sua associação com este microorganismo (WHO, 2002).

A contaminação dos ovos por salmonela se dá, inicialmente e, na maioria das vezes, através da casca. Tempo e temperatura de armazenagem são fatores fundamentais para que as salmonelas passem da superfície da casca para as estruturas internas do ovo (STALDEMAN, 1986; SILVA, 1995). A desinfecção e o resfriamento do ovo logo após a postura são procedimentos adotados em vários países como medidas para reduzir a contaminação e a multiplicação bacteriana (HAMMACK et al., 1993). Ovos podem também se contaminar via transovariana. Nesse caso, a contaminação está localizada na gema e os processos convencionais de desinfecção dos ovos não são eficientes.

A clara, em geral, apresenta-se com baixa contaminação por salmonelas, pois contém elementos naturais que dificultam o desenvolvimento bacteriano, como a presença de enzimas antibacterianas (lisozima) e a deficiência em ferro, elemento essencial para a multiplicação bacteriana. Contudo, a manipulação da clara no preparo de determinados pratos pode romper esse equilíbrio e favorecer a multiplicação de salmonelas.

A infecção dos ovos pode ocorrer através da passagem no oviduto (vertical) ou por contaminação fecal (horizontal); na primeira, seguindo infecção sistêmica ou ascendente, via cloaca. Deste modo a presença de *Salmonella* spp, em particular de *Salmonella* ser. Enteritidis se faz de forma silente, onde a contaminação ocorre em etapa anterior à formação da casca (CDC, 1992). As duas vias de infecção são sorovar-dependentes, onde a infecção por *Salmonella* ser. Enteritidis PT4, por exemplo, é mais comumente observada através do trato reprodutivo. Sua associação aos ovos pode estar, portanto, relacionada a fatores que aumentem sua capacidade de sobrevivência ao ambiente, como alguns fatores de virulência. A presença de fímbria do tipo 1 está relacionada à aderência de *Salmonella* ser. Enteritidis ao epitélio do oviduto de poedeiras, bem como a sua ligação a substâncias secretadas pelas glândulas do istmo. Por conseguinte, a infecção dos órgãos reprodutivos leva à produção de ovos contaminados (DE BUCK et al., 2004).

Outros sorovares, incluindo *Salmonella* ser. Typhimurium e *Salmonella* ser. Heidelberg também têm sido isolados do ovário de galinhas, naturalmente infectadas. Estes três sorovares quando presentes nas fezes podem penetrar na casca do ovo durante a postura, sendo interiorizados por meio de arranhaduras microscópicas na casca ou penetração pelos poros naturais, quando estes se mantêm em locais, cuja temperatura e umidade são elevadas (SCHOENI et al. 1995). Tais observações levaram a alteração das normas de transporte e manutenção em prateleira em alguns países do hemisfério norte, onde é preconizada a temperatura de refrigeração (WHO, 2002), inclusive no Brasil, através da RDC Nº 35, de 17 de junho de 2009 que estabelece a obrigatoriedade de incluir na rotulagem de ovos as instruções de conservação e consumo, que auxiliem o consumidor no controle do risco associado à presença de *Salmonella* spp neste alimento indicando a manutenção dos ovos preferencialmente refrigerados (BRASIL, 2009)

2.5. Controle de *Salmonella* - Irradiação de Alimentos

Considerando o envolvimento de produtos avícolas em doenças de transmissão alimentar, várias propostas vêm sendo adotadas para reduzir a incidência de contaminação por *Salmonella* em aves desde a criação. Procedimentos alternativos nas operações de processamento, tais como cloração e aquecimento de superfície, aplicação de *sprays* de ácido láctico em carcaças podem ser úteis na redução da contaminação (FERREIRA; ASTOLFI-

FERREIRA, 2006; BRASIL, 2002).

As elevadas perdas de alimentos em todo o mundo têm preocupado muitos países. Hoje, o homem deseja uma alimentação variada durante todo o ano. As estações do ano limitam essa possibilidade, enquanto que a conservação de alimentos por meios artificiais possibilita esse conforto (RIEDEL, 1996).

Existem vários métodos para conservar os alimentos. O que difere um do outro é a forma pela qual o alimento é tratado. A adequação do tipo de conservação ao tipo de alimento é extremamente importante. A aplicação correta de métodos adequados de conservação reduz o desperdício e as perdas causadas por insetos, roedores e microrganismos que, dessa maneira, têm suas fontes de alimentos interrompidas, o que por sua vez ajuda a controlar essas populações (RIEDEL, 1996). Várias são as tecnologias de preservação sendo as mais comuns o controle de temperatura (pasteurização, esterilização, refrigeração, congelamento), controle de umidade (desidratação), defumação, salga, controle de pH (acidificação, alcalinização), uso de produtos químicos (aditivos), gases (óxido de etileno, óxido de propileno, dióxido de carbono, dióxido de enxofre e ozônio) e antibióticos (STEFANOVA et al., 2010; HOBBS; ROBERTS, 1998).

A busca incessante por métodos de conservação mais sofisticados e rápidos, que mantenham o alimento seguro e prolonguem seu tempo de vida comercial, faz com que várias tecnologias venham sendo desenvolvidas visando melhorar a segurança e qualidade dos alimentos, utilizando processos alternativos de conservação, destacando-se dentre estes a irradiação (STEFANOVA et al., 2010; ARVANITOYANNIS et al., 2009).

O processo de irradiação vem se destacando como um método promissor entre os recursos atuais disponíveis para a preservação de alimentos. É um processo físico de tratamento comparável à pasteurização térmica, ao congelamento ou enlatamento.

As fontes empregadas em alimentos são isótopos radioativos emissores de radiação gama, como o ^{60}Co e ^{137}Cs , os raios X, gerados por máquinas que trabalham com energia de até 5MeV e elétrons, gerados por máquinas que trabalham com energia de até 10MeV. Entretanto, a irradiação produzida pelos feixes de elétrons e raios X apresenta baixo poder de penetração o que limita seu emprego na área de alimentos (SANTOS et al., 2003; DIEHL, 1990).

Os raios gama produzidos pelo cobalto 60 são altamente penetrantes e podem ser usados para tratar caixas cheias de alimentos frescos ou congelados (FAO/IAEA, 1999).

Deste modo, a irradiação com raios gama traz vantagens sobre os outros métodos usados para destruir bactérias nos alimentos, pois tem um alto conteúdo de energia e grande penetração e letalidade devido sua ação em nível celular. Sua penetração é instantânea, uniforme e profunda (HOBBS; ROBERTS, 1998; FRANCO; LANDGRAF, 1996;).

De acordo com o Centro de Energia Nuclear na Agricultura, quando se irradia os alimentos, submetendo a doses minuciosamente controladas de uma radiação particular, a radiação ionizante. A irradiação não causa prejuízos ao alimento no que diz respeito à formação de novos compostos químicos que poderiam transmitir doenças ao ser humano quando da sua ingestão. Porém, como em todo processo de conservação, podem existir perdas de ordem nutricional e organoléptica como a cor, o sabor, a textura e o odor (CENA, 2006)

Embora frequentemente referida como uma nova tecnologia, a irradiação de alimentos não é recente. No início da década de 1920, cientistas franceses descobriram que a irradiação poderia ser usada para conservar os alimentos. Após diversas investigações, o Food and Drug Administration (FDA), em meados da década de 60, autorizou pela primeira vez o emprego da irradiação em batatas e trigo. Na década de 80 (Quadro 3) seguiram-se as aprovações para o uso em especiarias e temperos, frutas frescas, carne suína, substâncias secas e desidratadas. Todavia, só em 1990, foi provado o uso da técnica em carcaças de frango, sendo que, ainda, há restrições para a utilização da irradiação em frutos-do-mar, ovos e carne (ANDRESS et al.,

2000; SPOLAORE et al., 2001). Em 1997, esse mesmo órgão aprovou seu uso em carnes vermelhas refrigeradas e congeladas. Em 2000 o FDA aprovou a irradiação de alimentos, a qual vem sendo empregada com sucesso na preservação de diferentes alimentos de origem animal e vegetal e permitiu a irradiação de ovos frescos para o controle de *Salmonella* (SPOLAORE et al., 2001).

Quadro 3. Cronologia da aprovação de produtos para irradiação

Ano	Agência*	Produto	Dose (kGy)	Objetivo
1963	FDA	Trigo e farinha de trigo	0,2 - 0,5	Desinfestação de insetos
1964	FDA	Batata	0,05 - 0,15	Inibição do brotamento e prolongar vida de prateleira
1983	FDA	Especiarias e vegetais secos	30 Máximo	Desinfestação de insetos e descontaminação
1985	FDA	Carne de porco fresca	0,3 - 1,0	Controle de <i>Trichinella spiralis</i>
1985, 1986	FDA	Enzimas secas ou desidratadas	10 máximo	Controle de insetos e/ou microorganismos
1986	FDA	<i>Frutas</i>	1,0 máximo	Retardo na maturação (amadurecimento) e desinfestação
1986	FDA	Vegetais frescos	1 máximo	Desinfestação de insetos
1986	FDA	ervas	30 máximo	Controle de microorganismos (descontaminação)
1986	FDA	Temperos	30 máximo	Controle de microorganismos
1986	FDA	Condimentos vegetais	30 máximo	Controle de microorganismos
1990	FDA	Aves frescas ou congeladas	3 Máximo	Controle de microorganismos (incluindo <i>Salmonella</i>)
1992	USDA	Aves frescas ou congeladas	3 Máximo	Controle de microorganismos (incluindo <i>Salmonella</i>)
1995	FDA	Carnes congeladas e embaladas (exclusivo para uso da NASA)	44 mínimo	Esterilização (destruição de microorganismos)
1995	FDA	Rações	2,0 a 25,0	Controle de <i>Salmonella</i>
1997	FDA	Carne vermelha crua refrigerada e congelada	4,5 máximo 7,0 máximo	Controle de microorganismos extensão da vida de prateleira
2000	USDA	Carne vermelha crua refrigerada e congelada	4,5 máximo 7,0 máximo	Controle de microorganismos extensão da vida de prateleira
2000	FDA	Ovos frescos	3	Controle de <i>Salmonella</i>

* FDA - Food and Drug Administration

USDA - United States Department of Agriculture

kGy- Kilogray

A irradiação é um método de pasteurização a frio, utilizado especialmente em alimentos que são consumidos crus ou parcialmente processados (LOAHARANU, 1997), além de apresentar característica única de poder ser aplicada em alimentos congelados (FARKAS, 1998).

Permite reduzir perdas causadas por processos fisiológicos (brotamento, maturação e

envelhecimento), além de eliminar ou reduzir microrganismos, parasitas e pragas, em muitos casossem causar qualquer prejuízo ao alimento, tornando-os também mais seguros ao consumidor (RAJKOWSKI et al., 2006; PEREIRA, 2004).

Na irradiação gama, para cada produto a ser irradiado são estabelecidos procedimentos específicos, inclusive diferentes doses de radiação. A unidade de energia absorvida é o Gray (Gy), que equivale a 1 Joule por quilograma (ou 10.000 erg/g) de alimento. Seu múltiplo mais usado é o kiloGray - kGy (MAHAPATRA, 2005; FAO/IEAE, 1999).

Os principais processos empregados em alimentos podem ser reunidos em três grupos: radurização que consiste na aplicação com doses <1kGy e que objetiva inibir brotamentos (batata, cebola, alho, etc.), retardar o período de maturação (frutas) e deterioração fúngica de frutas e hortaliças (morango, tomate, etc.) e controle de infestação por insetos e ácaros (cereais, farinhas, frutas, etc.). Proporcionam estocagem por longo prazo, sem uso de inibidores químicos de brotamento, prevenindo perdas sem o uso de fumigantes químicos e prevenindo a disseminação de pestes por insetos; a radicação ou radiopasteurização com dose média de 1kGy a 10kGy, sendo ideal para pasteurizar sucos, retardar a deterioração de carnes frescas, controlar *Salmonella* em produtos avícolas, pescado, especiarias, etc. e a radapertização ou esterilização comercial na qual são aplicadas doses elevadas (10 kGy – 45 kGy), utilizada na esterilização de carnes, dietas hospitalares e outros produtos processados, destruindo microrganismos, que promovem deterioração de alimentos e eliminação de patógenos, incluindo *Clostridium botulinum*. (CENÁRIO XXI, 2006; SPOLAORE et al, 2001).

Segundo HELSON (1997), os alimentos julgados mais importantes na transmissão de *Salmonella* são aves e seus produtos e a estratégia considerada mais eficiente para a sua redução, além da aplicação de normas dentro do sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), é o uso de irradiação, especialmente em ovos. Alguns estudos preliminares (SERRANO et al., 1997) concluíram que uma dose mínima de 0,5 kGy pode ser suficiente para eliminar *Salmonella* ser Enteritidis.

Em ovos irradiados, o emprego de doses variando de 0.5 a 1.5 kGy reduzem a contagem total de coliformes e *Salmonella*, os quais embora apresentando algumas diferenças sob o ponto de vista sensorial, permitiram o preparo seguro de maionese (AL.BACHIR; ZEINOU, 2006).

Entretanto outros estudos realizados neste século apontam dosagens variáveis até 1,8 kGy (WHO/FAO/OIE, 2004), dificultando o conhecimento quanto ao uso em nosso meio. O Brasil, como país tropical e com elevada capacidade de produção deve possuir critérios que não resultem em aumento vultoso de seu custo e ao mesmo tempo permitam minimizar o risco de disseminação de *Salmonella* spp.

No Brasil, a RDC nº 21 de 26/01/2001 aprovou o "Regulamento Técnico para a Irradiação de Alimentos" a qual permite a irradiação de alimento com as seguintes condições: a) a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade pretendida; b) a dose máxima absorvida deve ser inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e/ou atributos sensoriais dos alimentos; c) a embalagem deve ter condições higiênicas aceitáveis para o processo de irradiação e d) o rótulo do produto deve conter os dizeres "ALIMENTO TRATADO POR IRRADIAÇÃO" com as letras de tamanho não inferior a um terço (1/3) do da letra de maior tamanho nos dizeres de rotulagem" (Brasil, 2001). O logotipo abaixo, Radura, que significa "Tratado Por Irradiação", deve aparecer nas embalagens dos alimentos irradiados (Figura 2).



Figura 2. Radura: Símbolo internacional que indica que o alimento foi irradiado

Fonte: <http://en.wikipedia.org/wiki/Radura>

Considerando a segurança para o consumidor de produtos irradiados, SPOLAORE et al. (2001) assinalam que pequenos compostos são formados durante a irradiação e que os radicais livres e outros compostos produzidos são idênticos aos formados durante o cozimento, pasteurização, congelamento e outras formas de preparo e processamento. Entretanto, não existem evidências de que tais radicais sejam tóxicos, carcinogênicos, mutagênicos ou teratogênicos.

Por outro lado, o Instituto de Defesa do Consumidor (IDEC), adota uma posição de cautela em relação a essa tecnologia. Uma das argumentações do órgão é que a norma brasileira não define as doses máximas e mínimas de irradiação. Além disso, tecnicamente, os órgãos de fiscalização brasileiros não têm condições de avaliar ou medir a intensidade de irradiação após o alimento ter recebido o tratamento (CENÁRIO XXI, 2006). Outros aspectos se referem à formação de um composto (2-alquibutanonas ou 2-ACBs) que só ocorre nestes alimentos relatando que pesquisas realizadas em diferentes países da Europa, em 2002 demonstraram que esse composto apresenta propriedades cancerígenas. Refere-se ainda à redução da qualidade nutricional do alimento, o que é contestado pelos defensores da irradiação, os quais ressaltam que “todas as formas de se processar alimentos acarretam alguma perda de nutriente” (CENÁRIO XXI, 2006).

2.6. Efeitos da Irradiação Gama sobre os Microorganismos

Quando a radiação ionizante é absorvida por material biológico, como os microorganismos, por exemplo, seu alvo é a molécula de DNA. No entanto, outras alterações podem ser detectadas destacando-se a ação sobre a membrana celular afetando o transporte de substâncias essenciais para a atividade celular, o efeito no sistema enzimático, efeito na cadeia do DNA e RNA (síntese, reparo e reprodução) e alterações no metabolismo energético. Seu efeito é inversamente proporcional ao tamanho da molécula. Isto significa que se comparamos o genoma dos mamíferos com o de um microorganismo, o primeiro é mais facilmente atingido por fornecer maior número de informações genéticas (URBAIN, 1986).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

3.1.1. *Salmonella* ser. Enteritidis

O material objeto da presente investigação se constituiu de cepas de *Salmonella enterica* subspecie *enterica* ser. Enteritidis isoladas de infecções humanas, alimentos (subprodutos de aves e ovos) relacionados a surtos de origem alimentar e ambiente, selecionadas no banco de dados do Laboratório de Enterobactérias-LABENT-IOC-FIOCRUZ,

Estas são oriundas dos Laboratórios pertencentes ao Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública (LACEN/SVS/MS), LANAGRO/MAPA, empresas públicas e privadas, encaminhadas ao LABENT, para caracterização antigênica conclusiva.

3.1.2. Critérios laboratoriais para a seleção das cepas

Em uma primeira etapa foram selecionadas 25 cepas que apresentaram resistência a diferentes grupos de antimicrobianos, incluindo drogas de última geração, com a finalidade de selecionar aquelas com estabilidade em seus perfis e 15 cepas com sensibilidade absoluta.

Para tal, as cepas, mantidas em Caldo Cerebro-Coração (BHI/Oxoid) acrescido de 15% glicerol -70°C, foram semeadas em caldo BHI, incubadas por 4 a 6h a 37°C e isoladas em Agar Mueller Hinton - Oxoid (18 a 24h a 37°C).

A partir do crescimento, o *pool* de cinco colônias foi empregado para avaliação quanto ao perfil metabólico, suscetibilidade a diferentes classes de antimicrobianos, integridade em seu perfil antigênico e reatividade ao painel de fagos específicos para caracterização de fagotipos,

Da totalidade, inicialmente selecionada, vinte cepas apresentaram resultados idênticos (sendo 10/25 e 10/15), após a avaliação laboratorial ter sido repetida por vinte vezes, em diferentes intervalos de tempo. Estas foram empregadas para o desenvolvimento da presente investigação.

3.1.3. Ovos

A fim de garantir a ausência de patógenos que pudessem interferir nos resultados das análises, para os ensaios de irradiação foram utilizados ovos do tipo *Specific Pathogen Free* (SPF) de galinhas da linhagem “Single Comb Leghorn” Branca, oriundos de granjas localizadas no estado do Rio de Janeiro e fornecidos por Biomanguinhos/ FIOCRUZ-RJ. O peso dos ovos variou entre 50 e 60 g.

As inoculações foram realizadas no dia da chegada dos ovos ao laboratório. Assinala-se que os mesmos foram previamente avaliados quanto a sua qualidade, tendo sido utilizados somente ovos que apresentaram casca limpa, íntegra e sem deformação.

3.2. Metodologia

Considerando que a possibilidade de contaminação pode ser do tipo vertical e/ou horizontal, o processo de irradiação foi efetivado em duas etapas. Na primeira um grupo de 20

cepas foram submetidas à contaminação vertical (inoculação diretamente na gema) e na segunda etapa, foram comparados o comportamento de cinco cepas submetidas a contaminação horizontal (casca) e vertical.

3.2.1. Padronização do inóculo para os ensaios de irradiação (contaminação vertical e horizontal)

Três cepas de *Salmonella ser. Enteritidis* PT4 (cepas 71, 2682 e 2689), estáveis em suas características fenotípicas e genotípicas, foram utilizadas como modelos para determinar a quantidade de UFC/mL empregada nos experimentos de irradiação.

Esta foi determinada através de diluições decimais em água peptonada tamponada (BPW), tendo como referência o crescimento correspondente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, com leitura confirmada em espectrofotômetro (UNICO-1100).

Para cada cepa, foram feitas diluições subseqüentes em Salina Tampão Fosfato (PBS) correspondentes às concentrações de 10^2 a 10^8 UFC/mL.

Para a contaminação vertical, 0,1 mL de cada uma das diferentes diluições foi inoculado em seis ovos SPF, diretamente na gema, após sanitizar a casca com álcool a 70%GL.

Na contaminação horizontal, foram preparados volumes de 300mL das mesmas diluições e para cada concentração bacteriana, seis ovos foram submersos por 20 minutos.

Para ambas as vias de contaminação, a recuperação das cepas inoculadas foi avaliada através da semeadura por esgotamento de uma suspensão de 0,1 mL a partir de um pool de três gemas, em Agar Entérico Hektoen (Oxoid) em triplicata, incubadas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 h. Após este período, foi efetuada a contagem de colônias e estabelecida como diluição a ser empregada, aquela que permitiu a media de 100-300 UFC/mL. Esta etapa foi realizada no dia da inoculação e 24 h e 48h após para contaminação horizontal

3.2.2. Procedimentos de irradiação: Ovos submetidos á contaminação vertical

3.2.2.1. Obtenção do inóculo

Para cada dose de irradiação foram testadas 20 cepas de *Salmonella ser. Enteritidis*, pertencentes aos fagotipos PT1 (2), PT4 (12), PT9 (4) e duas não tipáveis (UT) sendo 10 resistentes a cefalosporinas de 3^a geração e/ou fluoroquinolona e 10 sensíveis a ambas as classes (Tabela 1).

Para cada experimento, a cepa de *Salmonella ser. Enteritidis* mantida em BHI/glicerol a -70°C foi inoculada em caldo BHI e, após incubação *over night*, realizado o isolamento em agar Hektoen ($36 \pm 1^{\circ}\text{C}$). A seguir, uma colônia do crescimento foi semeada em 5 mL de caldo Mueller Hinton e o frasco incubado a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 2-4 h a fim de alcançar a turbidez desejada (tubo 0,5 na escala de McFarland). A turbidez de todas as culturas foi ajustada entre 0,08 e 0,1 de absorvância a 625 nm e, diluições seriadas preparadas em PBS para obter suspensões com 10^5 UFC/mL.

Tabela 1. Características fenotípicas das 20 cepas utilizadas nos ensaios de irradiação

Cepa ^a	Fagotipo	Ano ^b	Fonte ^c	Penicilinas Cefalosporinas I, II ^d	Cefalosporinas III ^e	Quinolonas ^f	Fluoroquinolonas ^g
71	PT4	2005	AN	+	-	+	+
92	PT4	2005	AN	-	-	+	+
93	PT4	2005	AN	-	-	+	-
94	PT4	2005	AN	-	-	+	+
95	PT4	2005	AN	-	-	+	+
231	PT4	2006	AN	+	+	+	+
813	PT4	2009	HU	-	-	+	-
1683	PT4	2009	HU	+	-	+	-
1686	PT1	2009	HU	+	-	+	-
1862	PT4	2004	AN	+	+	-	-
3305	PT1	2008	HU	+	+	+	-
3411	PT9	2005	AN	+	+	+	-
3597	PT4	2005	AN	+	-	+	-
5452	PT9	2005	AB	+	+	+	-
7951	PT4	2004	AN	-	-	+	-
8155	PT9	2006	HU	+	-	+	+
8400	PT4	2004	HU	-	-	+	-
10483	PT9	2005	HU	-	-	+	-
11289	PT4	2005	AN	-	-	-	-
11318	PT4	2004	AN	-	-	+	-

^a cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis pertencentes a coleção do Laboratório de Enterobacterias/IOC/FIOCRUZ

^b Ano de isolamento

^c AN – animal HU – humana AB- ambiente

^d Ampicilina, Cefalotina, Cefoxitina

^e Ceftriaxona

^f Ácido nalidíxico

^g Ciprofloxacina

(+) Resistência (-) Sensibilidade

3.2.2.2. Inoculação da suspensão de *Salmonella* ser. Enteritidis diretamente na gema

3.2.2.2.1. Confirmação experimental do procedimento

Para garantir o procedimento técnico foi realizado experimentalmente, a inoculação de 100 µL de uma solução aquosa de azul de metileno na gema e imediatamente cozinhar os ovos durante 10 minutos em água fervente. A localização do corante inoculado foi verificada em pelo menos 10 procedimentos replicados, com abertura dos ovos após o resfriamento.

Observou-se que com a introdução de três quartos de uma agulha 30 x 7mm, a gema foi inoculada com segurança, procedimento que seguiu a orientação ditada por CARVALHO (2005).

3.2.2.2.2. Procedimento de Inoculação

- contaminação vertical - de acordo com Carvalho (2005) e modificações.

Para cada experimento de irradiação foram utilizados 22 ovos SPF, dos quais 15 eram inoculados e submetidos a diferentes dose de irradiação gama. Os demais utilizados como controle: três não inoculados/não irradiados (negativo), três inoculados/não irradiados (positivo) e um ovo inoculado somente com o diluente, não irradiado.

Os ovos tiveram a superfície higienizada com álcool 70°GL e foram mantidos dentro da cabine de segurança biológica para secagem.

Com o auxílio de uma “broca” esterilizada foi efetuada a perfuração da casca do ovo no lado oposto ao da câmara de ar com diâmetro suficiente para obter um orifício adequado a passagem da agulha. A inoculação foi efetuada com o auxílio de seringa com capacidade de 1 mL e agulha hipodérmica 30 x 7mm, introduzindo-se aproximadamente $\frac{3}{4}$ da agulha, diretamente na gema e depositando 0,1 mL da suspensão contendo 10^5 UFC/mL do cultivo, tomando por base a diluição bacteriana previamente padronizada. Logo após a inoculação, os orifícios dos ovos foram selados, usando selante de secagem rápida (cola a base de poliacetato de vinila; aditivos; pigmentos e água), com adição de fenol a 1%.

3.2.2.3. Irradiação dos ovos

Aproximadamente duas horas após a inoculação na gema, os ovos foram submetidos a irradiação gama efetuada em Irradiador de ^{60}CO (Gamma Cell 220 Excell, MDS Nordion – Canadá), com uma taxa de dose que variou de 53.7 a 43.4 Gy/min. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Instrumentação Nuclear (LIN/COPPE/UFRJ). Foram avaliadas diferentes doses de irradiação (0,49 – 0,54 – 0,59 – 0,8 – 1,0 – 1,2 – 1,5– 3,0– 5,0 e 10 kGy). Em sequência a irradiação, os ovos foram mantidos em temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$), por um período de até sete dias.

3.2.2.4. Recuperação e contagem de UFC/mL de *Salmonella* ser. Enteritidis

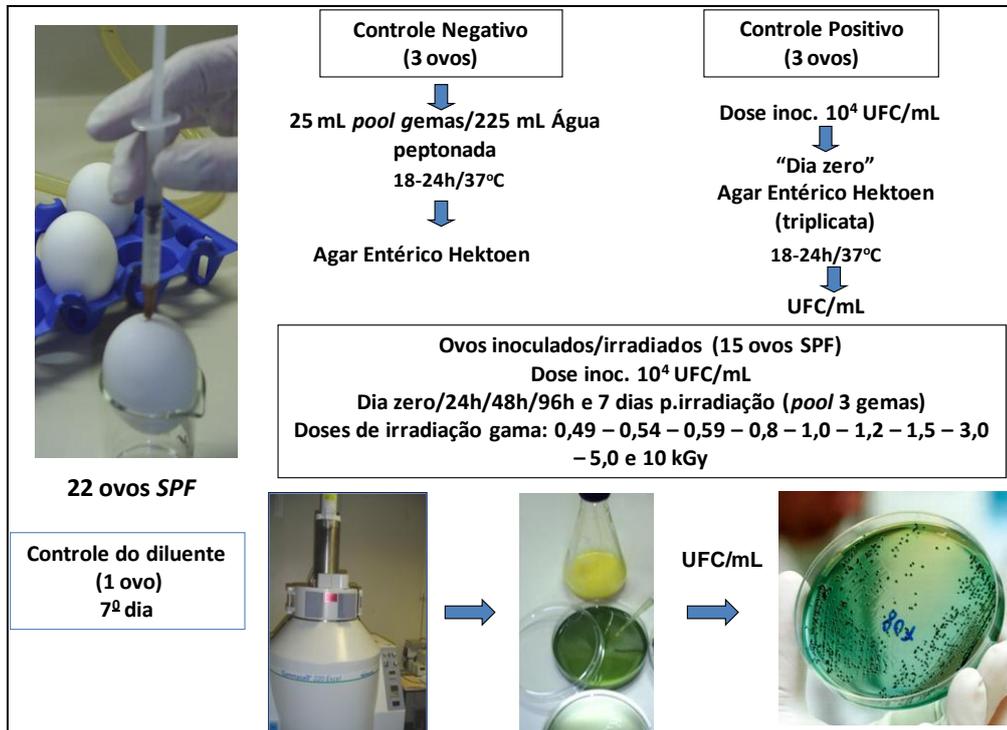
As tentativas de recuperação das cepas previamente inoculadas e posterior contagem das colônias foram realizadas nos ovos inoculados/não irradiados, no dia da inoculação e naqueles inoculados/irradiados no dia da inoculação (dia zero) e após 24h, 48h, 96h e 7 dias. Para cada análise, o procedimento executado consistiu na retirada da gema de três ovos, homogeneização em Vortex mixer (Gene2, VWR Scientific, Radnor, PA) e subsequente semeadura de 0,1mL do *pool*, com alça de Drigalsky, na superfície de placas de Agar entérico Hektoen, em triplicata, sendo em sequência incubadas a 37°C por 18 horas.

Para o grupo de ovos controle negativos (não inoculados/não irradiados), 25mL do pool de três gemas foram inoculados em 225 mL de água peptonada a 1,0% (pH 7,2), seguido de incubação a 37°C por 18-24h, com posterior semeadura em Agar entérico Hektoen.

Em uma primeira análise, foram anotadas as características do crescimento no meio seletivo, ao mesmo tempo em que se procedeu a contagem de UFC/mL (Fluxograma 1).

Quando da ausência de crescimento após 18 a 24 horas de incubação, as placas foram mantidas em temperatura ambiente por até cinco dias para observação, quando então foram descartadas.

Do crescimento obtido em Agar Entérico Hektoen, 3 a 5 colônias foram repicadas para tubos de Agar nutriente inclinado e paralelamente, nos meios de triagem para confirmação da integridade antigênica e bioquímica.



Fluxograma 1. Esquema de inoculação/irradiação dos ovos submetidos a contaminação vertical

3.2.3. Procedimentos de irradiação: Ovos submetidos à contaminação horizontal.

(De acordo com Wang; Slavik, 1998 e modificações).

Esta metodologia foi desenvolvida com o objetivo de identificar e avaliar a sobrevivência e migração de cinco cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis utilizando como modelo ovos SPF e os efeitos de diferentes doses de irradiação gama sobre as cepas inoculadas. Para tal, foram empregadas duas cepas daquelas utilizadas como modelo para obtenção do inóculo e três das 20 cepas anteriormente submetidas a contaminação vertical, tendo por base os resultados obtidos da irradiação de ovos inoculados diretamente na gema (Tabela 2).

Tabela 2. Características das cinco cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis empregadas no ensaio de contaminação horizontal

Cepa	Fonte*	Resistência			
		Cefalosporinas I, II	Cefalosporinas III	Quinolona	Fluoroquinolona
2682**	HU	S	S	R	S
2689**	AL	S	S	R	S
92	AL	S	S	R	R
3305	HU	R	R	R	S
3597	AN	R	S	R	S

* HU- humana AL – alimentar AN - animal

**Seleção aleatória entre cepas utilizadas para padronização do inóculo

Desse modo, foram avaliados os efeitos de três doses de irradiação (1,0, 1,5 e 3 kGy) sobre as cepas inoculadas.

3.2.3.1 Obtenção do inóculo

Para cada experimento, a cepa de *Salmonella* ser. Enteritidis foi inoculada em caldo BHI e, após incubação *over night* a $36 \pm 1^\circ\text{C}$, semeada em Agar Entérico Hektoen ($36 \pm 1^\circ\text{C}$). A seguir, 3 a 5 colônias foram repicadas para tubos com 10 mL de caldo Mueller Hinton e incubado a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 2-4 h. Posteriormente essas culturas foram transferidas para beakers esterilizados contendo 300 mL de PBS de modo a obter a concentração final de 10^8 UFC/mL (tubo 0,5 na escala de McFarland). A turbidez foi confirmada e ajustada em espectrofotômetro, conforme procedimento adotado no item 3.2.2.1.

3.2.3.2. Contaminação dos ovos e procedimentos de irradiação

Para cada cepa de *Salmonella* ser. Enteritidis, 24 ovos foram contaminados através da casca por submersão, durante 20 minutos, em PBS contendo uma concentração de 10^8 UFC/mL. Após secagem, os ovos foram acondicionados em recipientes estéreis, sendo que 9 destes, 24 horas pós-contaminação, foram irradiados em irradiador de ^{60}Co com doses de 1,0, 1,5 e 3 kGy, os 9 ovos restantes foram irradiados 48 horas pós-inoculação; seis ovos foram utilizados como controle (três não contaminados/não irradiados (negativo), três contaminados/não irradiados (positivo)).

Paralelamente, utilizando as mesmas cepas, procedeu-se a inoculação de *Salmonella* ser. Enteritidis (10^4 UFC/mL) em 12 ovos/cepa, diretamente na gema (contaminação vertical), sendo nove, submetidos às mesmas doses de irradiação e três, utilizados como controle positivo.

3.2.3.3. Recuperação e contagem de UFC/mL de *Salmonella* ser. Enteritidis

As tentativas de recuperação das cepas previamente inoculadas e posterior contagem das colônias foi realizada sete dias após a contaminação, em ambos os experimentos (contaminação vertical e horizontal), nos ovos irradiados e nos controles positivos, semeando-

se 0,1 mL de um pool de três gemas em Agar Hektoen, em triplicata, e posterior contagem das colônias (Fluxograma 2).



**Fluxograma 2. Esquema de inoculação/irradiação dos ovos
Submetidos a contaminação horizontal e vertical**

3.2.4. Avaliação das características fenotípicas e genotípicas de *Salmonella* ser. Enteritidis pós-irradiação

3.2.4.1. Confirmação bioquímica

Três a cinco colônias foram isoladas a partir do crescimento em Agar Hektoen, sendo semeadas paralelamente nos meios de triagem Costa & Vérnin (CV) e Agar Lisina Ferro (LIA) e incubados a 37°C/18 a 24 horas (COSTA; HOFER, 1972).

A avaliação de seu perfil bioquímico foi efetuada através da semeadura em meio de SIM, para comprovação da mobilidade, produção de indol e gás sulfídrico, utilização do citrato como fonte única de carbono, fermentação da lactose e sacarose, descarboxilação da L-lisina, provas estas que definem presuntivamente o gênero *Salmonella* de acordo com os critérios estabelecidos por Costa e Hofer (1972).

3.2.4.2. Caracterização antigênica

Todos os isolados recuperados pós-irradiação foram submetidos a técnica de soro aglutinação rápida, em lâmina, com antissoros poli e monovalentes, somáticos e flagelares,

preparados no Laboratório de Enterobactérias, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ para confirmação da integridade antigênica.

A identificação do sorovar específico foi realizada com base no esquema antigênico de Kauffmann-White e representada de acordo com os critérios de Grimont; Weill (2007), resumidamente descrito a seguir:

O crescimento obtido em tubos com Agar Nutriente inclinado, após incubação de 24h a 37°C, foi suspenso em aproximadamente 2 mL de solução 0,85% de cloreto de sódio. A caracterização antigênica foi realizada após a verificação da estabilidade da suspensão, visando eliminar formas rugosas (auto-aglutinação).

3.2.4.3. Manutenção e estoque dos isolados

A presença de *Salmonella* spp. implicou na inoculação de um *pool* de cinco colônias em Agar Nutriente Fosfatado em temperatura ambiente (COSTA; HOFER, 1972) e em caldo BHI, com subsequente adição de glicerol 15%, após incubação 37°C/18h e preservação a -70°C.

Por ocasião das demais análises feno e genotípicas, as cepas em estoque foram semeadas em caldo BHI, incubado por 4/6h a 37°C com posterior semeadura em Agar Mueller Hinton (37°C-18/24h). A partir do crescimento, o *pool* de cinco colônias foi empregado para as diferentes análises.

3.2.4.4. Fagotipagem

- de acordo com Ward *et al.* (1987)

Realizada utilizando painel de preparados fágicos fornecidos pelo Public Health Laboratory Service (Reino Unido), Centro de Referência Internacional de Fagotipagem.

Para a realização deste procedimento as cepas foram submetidas ao crescimento em caldo Fago (Caldo Nutriente - Difco adicionado de cloreto de sódio 0,85g%) e incubados a 37°C até atingir uma turbidez similar ao tubo nº 0,5 da escala de MacFarland. Deste volume de 0,1mL foi semeado na superfície de uma placa contendo Agar Fago (Caldo Fago acrescido de 1,5g% de Agar agar-Difco). Após absorção do inóculo, nas áreas circulares (marcadas no fundo externo da placa de Petri), foi efetivada a deposição individual de 10µL de cada um dos preparados fágicos necessários para a identificação dos fagotipos de *Salmonella* ser. Enteritidis (painel de 20 preparados fágicos específicos prontos para uso (RTD – Routine Test Dilution). Após absorção, foi efetuada a incubação a 37°C/18h com leitura de acordo com o tipo de lise (confluente, opaca, semi confluente) e número de placas de lise.

Cepas com resultados dúbios foram encaminhadas ao Public Health Agency of Human and Animal Science, Canada, para a confirmação do perfil obtido.

3.2.4.5. Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos

A confirmação do perfil de resistência aos antimicrobianos foi realizada através do método de disco-difusão com base na metodologia descrita por Bauer et al. (1966), atualizado anualmente pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Foram utilizadas 12 drogas da marca OXOID: representativas das classes de antimicrobianos beta-lactâmicos (penicilinas, cefaloporinas de 1^a, 2^a e 3^a gerações, carbapenens); fenicóis; tetraciclínas; quinolonas; aminoglicosídeos; antifolatos e nitrofuranos (Quadro 4). O critério de escolha teve por base, drogas empregadas sob o ponto de vista humano e veterinário e a orientação da OMS quanto aos antimicrobianos utilizados no monitoramento da resistência bacteriana. Para a padronização do inóculo foi utilizado espectrofotômetro e a medição dos halos de inibição,

por paquímetro digital. Para o controle da qualidade de execução e confiabilidade dos resultados obtidos, cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *E.coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) foram testadas sob as mesmas condições de cultivo e incubação

Quadro 4. Drogas utilizadas para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana

Classes	Antimicrobianos	Concentração	Sigla
Aminoglicosídeos	Gentamicina	10 µg	GEN
Antifolatos	Sulfametoxazol - Trimetoprim	23,75/1,25 µg	SXT
β-Lactâmicos			
Carbapenemas	Imipenem	10 µg	IPM
	Cefalotina	30 µg	CEP
Cefalosporinas	Cefoxitina	30 µg	FOX
	Ceftriaxona	30 µg	CRO
Penicilinas	Ampicilina	10 µg	AMP
Fenicois	Cloranfenicol	10µg	CHL
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	300 µg	NIT
Quinolonas	Ácido Nalidíxico	30 µg	NAL
	Ciprofloxacina	5 µg	CIP
Tetraciclinas	Tetraciclina	30 µg	TCY

3.2.4.6. Avaliação semi quantitativa para a produção de biofilme

Nesta etapa foram selecionadas 10 das 20 cepas de *Salmonella* ser Enteritidis (originais, não irradiadas) bem como 25 subculturas, recuperadas após diferentes doses de irradiação e que apresentaram crescimento confluyente como fina película, firmemente aderentes na superfície do meio de cultura Agar Entérico Hektoen, totalizando 35 análises.

A capacidade de produção de biofilme foi determinada quantitativamente, em placas de microtitulação de poliestireno contendo 96 poços, de fundo chato por meio de um ensaio modificado, tendo como base os métodos descritos por (MOHAMED; HUANG, 2007; STEPANOVIC et al. 2000).

As cepas foram cultivadas em 4mL de caldo Muller-Hinton a 37°C por 24h. Aliquotas de 300µL de cada cultura foram transferidas para tubo contendo PBS para ajustar a concentração da Densidade Ótica a 625 nm (OD₆₂₅) das amostras em espectrofotômetro cuja leitura pode variar de 0,05 ate 0,10.

Após a padronização foram transferidos 20µL de cada cultura bacteriana para os poços da microplaca contendo 200µL de Caldo Triptosado de Soja (TSB-Oxoid) +1% de Glicose (Oxoid) e incubado por 18 horas a 37°C. Em seguida, com o auxílio de pipeta multicanal, o sobrenadante foi aspirado e descartado procedendo-se a lavagem por 3 vezes com PBS de modo a remover as células não aderidas. Em sequência, procedeu-se a coloração das bactérias aderidas pela adição de 50µL da solução aquosa cristal violeta (Difco) a 0,5%, mantido por 10 minutos. Terminado este periodo, os poços foram lavados por 3 vezes com agua destilada esterilizada e as placas colocadas para secar no fluxo laminar. O corante

ligado às células aderentes foi ressolubilizado com 200 µL de etanol absoluto por 30 minutos. Em sequência, 150µL desta solução foram transferidos para outra microplaca de poliestireno com 96 orifícios. Cada ensaio foi realizado em triplicata e repetido três vezes, sendo obtidas as médias das DO. Este experimento incluiu também uma cepa como controle positivo (forte produtor de biofilme, *Salmonella* ser. Typhimurium ATCC14028) e como controle negativo, *Escherichia coli* K-12 DH5.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro com densidade óptica em 570nm (OD₅₇₀) tendo sido definido o controle negativo como a média da DO. Todas as cepas foram classificadas nas categorias: forte, moderado, fraco e não produtor de biofilme de acordo com os critérios de Mohamed et al. (2007) e para melhor apreciação, no presente estudo, procurou-se representar pelos sinais +++/++/+/- (Quadro 5.)

Quadro 5. Parâmetros de avaliação da capacidade de produção de biofilme
(MOHAMED; HUANG, 2007).

Forte produtor de biofilme	OD ₅₇₀ > 2,0	+++
Moderado produtor de biofilme	OD ₅₇₀ 1,0 – 2,0	++
Fraco produtor de biofilme	OD ₅₇₀ >0,5 - <1,0	+
Não produtor	OD ₅₇₀ ≤ 0,5	-

3.2.5. Avaliação das características genotípicas

3.2.5.1. Caracterização molecular dos genes de resistência antimicrobiana

A orientação ditada na presente investigação tomou por base a avaliação da suscetibilidade a ceftriaxona, ácido nalidíxico e ciprofloxacina para a caracterização dos genes de resistência através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para a seleção das cepas, foram confrontados os resultados obtidos considerando a manutenção ou perda da resistência a esses três fármacos em relação a dose e tempo pós-irradiação.

3.2.5.1.1. Tratamento da amostra extração e purificação do DNA

Para a extração de DNA das cepas foi empregado o kit Qiagen, através de PCR convencional cujo procedimento resumido é apresentado a seguir:

- Transferência de 1,0mL de cada cultura para tubos de microcentrifuga (1,5 mL) e centrifugação a 7.500 rpm/10 minutos;
- Descarte do sobrenadante e ressuspensão em tampão ATL (180µL) no qual é adicionado 20µL de proteinase K e homogeneizado em Vórtex;
- Incubação em banho-maria a 55°C/10 minutos;
- Adição de 200µL de tampão AL e homogeneização em Vórtex, incubação em banho-maria a 70°C/10minutos, adição de 200µL etanol absoluto, homogeneização em Vórtex;
- Transferência para tubos acoplados a suporte aos tubos da microcentrifuga;
- Centrifugação a 8.000 rpm/2 minutos e separação da coluna de sílica-gel
- Acoplagem a novo suporte, adição de tampão, 8.000 rpm/2 minutos;
- Repetição da etapa anterior e centrifugação a 12.000 rpm/4 minutos;

- Separação da coluna e acoplagem a tubo para microcentrifuga, com adição de 200µL de Tampão AE e centrifugar a 8.000 rpm/ 2 minutos, com retirada do DNA purificado (manutenção a -20°C)

3.2.5.1.2. PCR convencional

Os genes de resistência antimicrobiana foram avaliados utilizando *primers* específicos de acordo com os perfis das cepas, cuja seqüência dos iniciadores e combinações encontram-se no GeneBank

As reações de amplificação foram preparadas em volume de 25 µL por tubo e o teste de PCR realizado no termociclador (Bio Rad, Modelo My Cycler), cujos produtos obtidos se encontram de acordo com o Quadro 6.

Quadro 6. Relação dos primers utilizados na caracterização dos genes de resistência antimicrobiana e condições de amplificação

Gene	Sequencia 5' - 3'	Primers	Temp. Anelamento/ Resistência	Produto
<i>gyrA</i>	F	TGTCCGAGATGGCCTGAAGC	55°C	Quinolona 626 pb
	R	CGTTGATGACTTCCGTCAG		
<i>gyrB</i>	F	GGACAAAGAAGGCTACAGCA	61°C	Quinolona 880 pb
	R	CGTCGCGTTGTACTCAGATA		
<i>bla_{CTX}</i>	F	CATTTCGGTGTGCGCCCTTAT	55°C	β-Lactamase 544 pb
	R	TCCATAGTTGCCTGACTCCC		

Ao final das amplificações, o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X, durante aproximadamente 1 hora, voltagem de 70 Volts, tendo sido incluído em cada gel um padrão de peso molecular (Amersham Pharmacia). Após a migração, os produtos foram corados por imersão do gel em solução de brometo de etídio (0,5%), visualizados em Sistema de foto documentação (Image Quant 300) e, em seguida, digitalizadas e salvas em banco de dados.

3.2.5.2. Detecção dos genes de virulência

Esta avaliação foi efetivada em três cepas, representativas de resistência a irradiação ⁶⁰CO até 3,0 kGy (cepa 3305), 5 kGy (cepa 3597) e a 10,0 kGy (cepa 92), realizada na Área de Biotecnologia do Centro Estadual de Pesquisa em Sanidade Animal Geraldo Manhães Carneiro, PESAGRO, RJ.

Foram pesquisados um total de 10 genes sendo quatro cromossômicos e plasmidiais e seis localizados em Ilhas de Patogenicidade (Anexo A).

3.2.5.2.1. Extração do DNA Bacteriano

Alíquotas do crescimento bacteriano em Agar Sangue, em cultura por 18h/37°C foram empregados para a extração do DNA. Para a obtenção do DNA, a amostra foi suspensa em água ultra pura, e posteriormente feita a extração através da fervura dos microtubos em banho-maria, a 100°C, por 10 minutos.

3.2.5.2.2. Amplificação do DNA Bacteriano

Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores para a detecção dos genes *orgA*, *mgtC*, *phoP/Q*, *spvC*, *stn*, *slyA* de acordo com aqueles descritos por Soto et al. (2006), *sipA*, *hilA* (BOHEZ et al., 2006), *invE/A* (GUERRA et al., 2000) e *siE* (KISS, MORGAN; NAGY, 2007) apontados no Quadro 7. As reações de amplificação foram preparadas em volume de 25 µL/tubo, com programação de ciclos correspondendo à desnaturação do DNA; anelamento dos iniciadores na região alvo e alongamento da fita de DNA, em diferentes tempos e temperaturas, correspondentes a cada iniciador utilizado, de acordo com os protocolos (Anexo B).

Quadro 7. Relação dos “primers” utilizados na caracterização de genes de virulência

Gene	Específico para	Seqüência de Oligonucleotídeos	Pares de Base (pb)
<i>inv E/A</i>	SPI 1	F: TGCCTACAAGCATGAAATGG	500 pb
		R: AAAGTGGACCACGGTACAA	
<i>orgA</i>	SPI 1	F: GATAAGGCGAAATCGTCAAATG	540 pb
		R: GTAAGGCCAGTAGCAAAAATG	
<i>slyA</i>	Regulação da transcrição	F: GCCAAAAGTGAAGCTACAGGTG	700 pb
		R: GTATCGACCACCACGATGGTT	
<i>phoP/Q</i>	Sistema regulatório	F: ATGCAAAGCCCGACCATGACG	299 pb
		R: GTATCGACCACCACGATGGTT	
<i>stn</i>	Enterotoxina	F: TTAGGTTGATGCTTATGATGGACACCC	617 pb
		R: CGTGATGAATAAAGATACTCATAGG	
<i>spvC</i>	Plasmídeo de virulência	F: ACTCCTTGACAACCAAATGCGGA	424 pb
		R: TGTCTTCTGCATTTCCGCCACCATCA	
<i>sipA</i>	SPI 1 (polimerização da actina)	F: CAAACGTTGATACCCCTGCT	766 pb
		R: CGGTCGTACCGGCTTTATTA	
<i>hilA</i>	SPI 1 regulador do SST3	F: GGATCAGGTTCAATCCGAGA	500 pb
		R: AGTAAGGCGCAATGCTGTTT	
<i>mgtC</i>	SPI 3	F: TGAATATCAATGCTCCAGTGAAT	655 pb
		R: ATTTACTGGCCGCTATGCTGTTG	
<i>siE</i>	SPI 4 (adesina)	GCGCAAAAGTTTCTCTTTCCGGGCCAGACATGAACATTACCA	608 bp
		CGCCGCGTGTGTAGGCTGAGGCTGCTTC	
		CTTTCTGGTTAGTTATCGGCAGAGTAAACTCTTCTCCT TCAAACATAATACCATATGAATATCCTCCTTAGTTCCTATTC	

3.2.5.2.3. Detecção do produto amplificado

Para cada 10 µL do produto amplificado de cada amostra foi adicionado 3 µL do tampão de corrida, homogeneizados e colocados 10 µL em cada poço do gel de agarose a 1,5%. O produto amplificado juntamente com o marcador de pares de base foram separados por eletroforese a 80V, durante 1:30h. O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL), visualizado em sistema de fotodocumentação Image Quant.

3.2.5.3. Determinação do perfil genômico (PFGE)

Para avaliar o perfil genômico das cepas irradiadas de *S. Enteritidis* foi empregada a técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE). Os procedimentos de preparação e extração do DNA e digestão com enzimas seguiram as orientações de Pfaller et al. (1992), Tenover et al (1995), Olive (1999) e Heir et al. (2000) tendo sido empregado as enzimas *XbaI* e *BlnI* de acordo com o protocolo estabelecido no programa PULSENET-WHO-CDC.

Para a separação dos fragmentos de restrição, foi utilizado o sistema CHEF DRIII, implantando-se condições de temperatura, ciclos, voltagem e tempos específicos. O gel foi corado utilizando solução aquosa de brometo de etídio com subsequente lavagem e visualização sob UV, com a digitalização da imagem pelo sistema de fotodocumentação Image Quant, tendo como marcador de peso molecular a cepa padrão *Salmonella* ser Braenderup H9812.

A análise do padrão de bandamento foi realizada através do software “Bionumerics” (Applied Maths) para realizar comparações dos padrões de restrição, determinando o percentual de similaridade entre as cepas. A partir da geração de uma matriz, utilizando o coeficiente de Dice, foram reunidos os padrões em grupos pelo método UPGMA, resultando em um dendograma.

3.2.5.3.1. Preparação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano

Salmonella ser. Enteritidis, assim como a cepa padrão *Salmonella* ser. Braenderup H9812, foram crescidas em Agar Nutriente (Difco) por 14-18 horas a 37°C. As células foram então, suspensas em 4 mL de tampão (Tris 100mM; EDTA 100mM, pH8,0, Sigma-Aldrich Biotechnology) e ajustadas a uma absorvância de 0.1 – 0.2 (comprimento de onda de 610nm em PS500-1 Spectrophotometer, Sigma-Aldrich Biotechnology, EUA). Uma alíquota de 400µL da suspensão de células foi adicionada a 20µL de proteinase K (20mg/mL, Sigma-Aldrich Biotechnology) e misturada por inversões consecutivas, (5 a 6 vezes). No preparo dos blocos de agarose utilizou-se um volume de 400µL de agarose SeaKen Gold 1% (Cambrex), previamente fundida e mantida a 55°C até o momento da moldagem. Com o cuidado para não solidificar e nem formar bolhas de ar, os moldes para a formação dos blocos foram preenchidos com a mistura e, em seguida, mantidos de 2 a 8°C por 5 minutos para a polimerização da agarose.

3.2.5.3.2. Extração e purificação do DNA bacteriano

Após a polimerização, os blocos de agarose foram removidos dos moldes e submersos em 5mL de tampão de lise celular TE (Tris 50mM; EDTA 50mM, pH 8,0) acrescido de Sarcosyl 1% (*N*-Lauroylsarcosine sodium salt - Sigma-Aldrich Biotechnology) com proteinase K em uma concentração final de 0,1mg/mL (Sigma-Aldrich Biotechnology), dispensados em tubos do tipo Falcow (50mL). Em seguida, os tubos foram incubados em

banho-maria (55°C por 2 horas, sob agitação de 150rpm), para promover a lise da parede celular. Após a retirada do tampão, os blocos de agarose foram lavados por 4 vezes com 10mL de água bidestilada esterilizada, seguidas de 4 lavagens com 10 mL do tampão CHEF-TE 1X (EDTA 0,5M; Tris-base 1M, pH 8,0), em intervalos de 10 minutos sob agitação de 200 rpm.. No final dessa etapa, os blocos de agarose foram armazenados em tampão CHEF-TE 1X, á temperatura de 2-8°C, até o momento da digestão.

3.2.5.3.3. Seleção da endonuclease de restrição e digestão do DNA

Seguindo a metodologia preconizada foram empregadas as enzimas *XbaI* seguida pela *BlnI* (RIBOT et al., 2006). Numa primeira análise, realizada com 10 cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis utilizando as enzimas de restrição *XbaI* (50U/ μ L, Roche) e *BlnI* (10U/ μ L, Roche), foram submetidas a uma corrida com voltagem de 6V e temperatura de 14°C, variando o tempo de eletroforese. Segundo o protocolo do “Pulsenet”, as seguintes condições foram avaliadas quanto a restrição com *XbaI*: tempo de pulso de 2.2-63.8s por 17 a 18 horas. Na restrição com *BlnI*, tempo de pulso de 2.2 – 54.8s por 17 a 18 horas. Como melhor resolução, no que tange ao número de bandas geradas e variabilidade de perfis, selecionou-se a restrição por 2 horas com a enzima *XbaI* (30U/ μ L), e que foram aplicadas as demais cepas.

Os géis foram corados com solução de brometo de etídio a 0,5% (Sigma-Aldrich Biotechnology) e visualizados sob iluminação ultravioleta no equipamento de fotodocumentação ImageMaster VDS (Amershan Pharmacia Biotech). Os fragmentos de macrorrestrição foram analisados em software BioNumerics – Master Script IV (Applied Maths) e comparados através de uma matriz de similaridade, aplicando o coeficiente de Dice com 1,5% de tolerância de posição para *Salmonella* ser. Enteritidis, com otimização de 1,5%, usando UPGMA. A análise foi realizada resultando em dendograma, com representação gráfica ou filogenética entre as cepas analisadas.

3.2.6. Análise dos Resultados

Para a análise estatística dos resultados da irradiação os experimentos foram planejados, de acordo com um delineamento em blocos ao acaso, com dois fatores, níveis de irradiação e períodos de avaliação e 20 repetições por tratamento (cepas).

Para a análise dos dados de contagens microbianas, os mesmos foram previamente transformados em logaritmos e em seguida analisados pelo teste F de Fisher-Snedecor (análise de variância).

A comparação das médias dos fatores foi realizada pelo teste de Tukey e as tendências através da análise de regressões curvilíneas (SNEDECOR; COCHRAN, 1976).

4. RESULTADOS

4.1. Determinação dos Inóculos para os Ensaio de Irradiação

Considerando que o conteúdo dos ovos naturalmente apresenta elementos de defesa, minimizando qualquer contaminação, procurou-se, por testes *in vivo* (inoculação em ovo) e *in vitro*, semeadura e contagem de UFC/mL em placas de meios de cultura, estabelecer a dose adequada para os ensaios de irradiação. Verificou-se que, com a inoculação diretamente na gema, de 0,1mL da diluição 10^5 bem como contaminação da casca com uma suspensão de 10^8 UFC/mL, os resultados permitiram utilizar estas suspensões bacterianas como inóculo padrão e parâmetro para avaliar a população bacteriana sobrevivente pós-irradiação, nos ensaios de contaminação vertical e horizontal, respectivamente.

4.2. Ensaio de Irradiação

4.2.1. Características visuais dos ovos pós-irradiação

A princípio a análise visual das características estruturais dos ovos irradiados, revelou fluidez da clara com todas as doses de irradiação. Doses $\geq 1,0$ kGy apresentaram alterações na gema, tornando-se mais espessas e rompendo com facilidade. Além disso, as claras dos ovos inoculados e irradiados, mantidos por até uma semana pós-irradiação em temperatura ambiente (25°C) apresentaram-se turvas, com tonalidade amarelada.

4.2.2. Recuperação e contagem de UFC/mL de *Salmonella ser. Enteritidis*.

Os resultados do isolamento de *Salmonella* a partir dos ovos contaminados experimentalmente e submetidos à irradiação gama, revelou em todos os ensaios, ausência de crescimento naqueles testados no mesmo dia da inoculação (dia zero), e progressiva recuperação da cepa ao longo dos intervalos subseqüentes. Por outro lado, houve recuperação da cepa previamente inoculada, nos ovos controle positivos (inoculados e não-irradiados) no mesmo dia da inoculação.

4.2.2.1. Contaminação vertical

Em uma primeira etapa, com a finalidade de selecionar o ponto de corte (*breakpoint*) para os ensaios de irradiação, foram testadas quatro das vinte cepas para as doses 0,49, 0,54, 0,59, 0,8, e 1,0 kGy. Tendo em vista que todas as cepas foram recuperadas com as doses de 0,49 a 0,8 kGy no intervalo de tempo analisado e cujas contagens foram uniformemente $\geq 10^5$ UFC / mL, ficou estabelecida como ponto de partida para as demais análises, a dose de 1,0 kGy.

A análise das 20 cepas revelou que a totalidade das cepas foram resistentes a dose de 1 kGy, sendo 19 recuperadas já às 24 horas pós-irradiação. Para as demais doses, doze cepas (60,0%), apresentaram resistência a 1,5 kGy e sete a 3,0 kGy (35,0%). A dose de 5,0 kGy foi mais eficaz na redução e/ou eliminação da carga bacteriana, com apenas duas amostras resistentes (10%). (Figura 3)

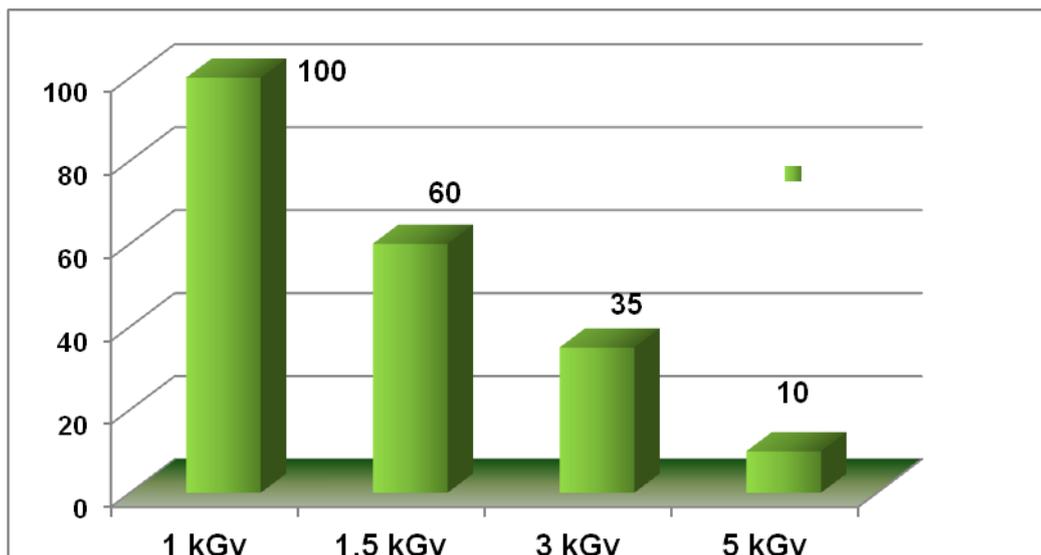


Figura 3. Percentuais de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis resistentes às diferentes doses de irradiação

O efeito das diferentes doses de irradiação sobre a população bacteriana revelou que entre as 20 cepas resistentes a 1,0 kGy, uma apresentou crescimento apenas a partir de 96 horas após a irradiação com uma redução de dois ciclos log, as demais apresentaram contagens $\geq 10^5$. Entre as doze cepas resistentes a 1,5 kGy, quatro (33,3%) foram recuperadas somente sete dias após a irradiação com redução de dois ciclos log. A dose de 3 kGy foi eficaz na redução e / ou eliminação da população bacteriana em 13 de 20 cepas (65%) analisadas durante o período experimental. Entre as sete cepas resistentes, uma mostrou redução de três ciclos log e quatro apresentaram uma redução de dois ciclos log. Estas foram recuperadas somente após quatro dias e uma semana pós-irradiação, respectivamente. No entanto, duas amostras (cepas 92 e 3597), resistentes a 5 kGy, foram recuperadas somente 96h pós-irradiação com uma redução da contagem de colônias de dois ciclos log (10^2 UFC / mL) em uma cepa e $\geq 10^5$ UFC / ml na outra (Figuras 4 e 5).

Os resultados obtidos pelas 20 cepas estão apresentados no Anexo C.

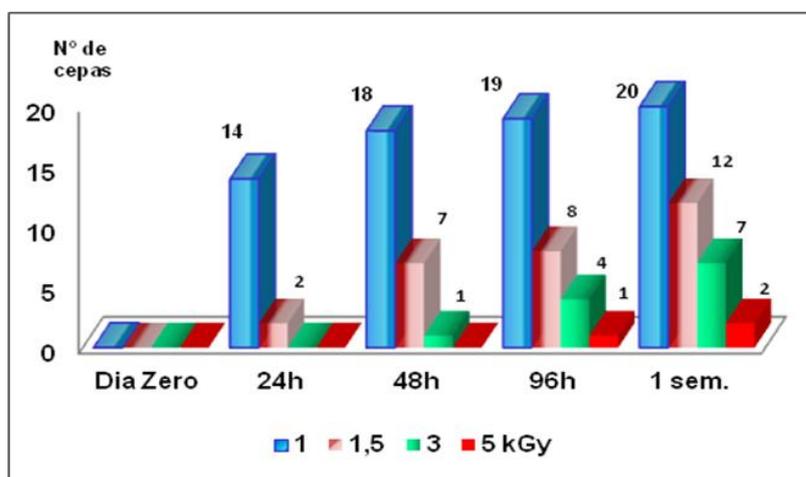


Figura 4. Evolução da recuperação de *Salmonella* ser. Enteritidis em função da dose de irradiação e período de análise

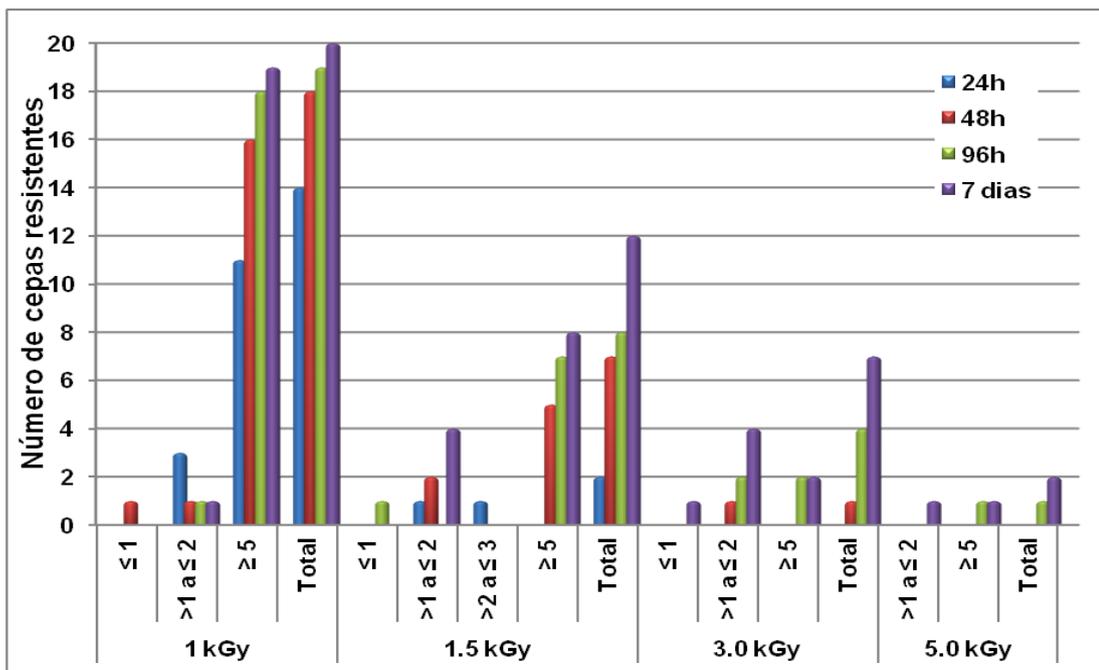


Figura 5. Recuperação de *Salmonella ser. Enteritidis* de acordo com a carga microbiana (logUFC/mL), período e dose de irradiação

A contagem de colônias nos diferentes períodos, após a exposição a diferentes doses de irradiação, evidenciou que o maior crescimento microbiano (log UFC / mL) foi observado com a dose de 1kGy, seguido por 1,5 kGy e tornou-se mais inibido com doses de 3 e 5 kGy, não havendo diferença significativa de ($P > 0,05$) entre as médias de ambas porém demonstrando uma redução significativa ($P < 0,01$) na contagem microbiana em relação ao aumento das doses, desde o primeiro até o sétimo dia de análise, quando o crescimento microbiano atingiu o pico (Figura 6).

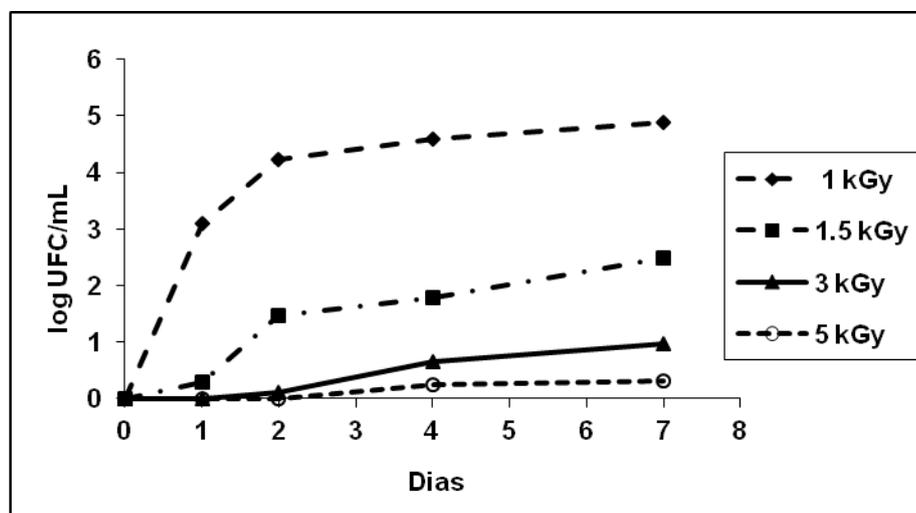


Figura 6. Frequência de recuperação de *Salmonella ser. Enteritidis* de acordo com a carga microbiana (log UFC /mL),dose de irradiação e tempo pós-irradiação

Adicionalmente, as duas cepas resistentes a dose de 5 kGy (cepas nº 92 e 3597), foram submetidas a irradiação com 10kGy. Destaca-se sensibilidade da cepa 3597 e recuperação da cepa 92 somente aos 4 ($1,1 \times 10^2$ UFC/mL) e 7dias ($0,6 \times 10^2$) pós-irradiação, com 3 e 4 dias de incubação das placas, respectivamente.

4.2.2.2. Contaminação horizontal e vertical

Os resultados obtidos com as cinco cepas submetidas a contaminação horizontal (casca) e vertical (gema) evidenciaram a presença e recuperação de *Salmonella* ser.Enteritidis na gema dos ovos controles, cujos escores chegaram $\geq 10^5$ UFC / mL dentro de 24 h nas duas vias de contaminação.

Em relação à dose de 1 kGy, observou-se que as cinco cepas foram resistentes apresentando crescimento confluyente ($\geq 10^5$ UFC / mL), enquanto para as demais doses, apresentaram suscetibilidade variável. Salienta-se a sensibilidade absoluta de duas cepas a dose de 3 kGy nos ovos contaminados através da casca e uma cepa, submetida a inoculação diretamente na gema (Tabelas 3 e 4).

Verificou-se que nos ovos contaminados pela casca e irradiados com 24 horas de inoculação houve diferença significativa ($P < 0,05$) das médias de contagens de *Salmonella*, sendo que a contagem média com a irradiação de 3.0 kGy foi significativamente inferior à obtida com a irradiação de 1.0 kGy, o que mostra a eficácia da dose de 3,0 kGy nesta via de contaminação. Naqueles irradiados com 48 horas pós-contaminação, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as médias de contagem de *Salmonella* considerando as três doses de radiação.

Nos ovos inoculados diretamente na gema e irradiados no mesmo dia de inoculação verificou-se que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) das médias de contagens de *Salmonella* com os três níveis de irradiação utilizados.

Tabela 3. Suscetibilidade de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis frente a diferentes doses de irradiação gama (kGy) em ovos SPF submetidos a contaminação horizontal

Cepa	Irradiação pós.inoculação	Abertura dos ovos	Doses (kGy)		
			1.0	1.5	3.0
92	24	7 dias	$\geq 10^5$	$0,42 \times 10^2$	$0,03 \times 10^2$
	48		$\geq 10^5$	$0,53 \times 10^2$	$0,2 \times 10^2$
2682	24	7 dias	-	-	-
	48		$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
2689	24	7 dias	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$0,21 \times 10^2$
	48		$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
3305	24	7 dias	$\geq 10^5$	$0,41 \times 10^2$	-
	48		$\geq 10^5$	$0,08 \times 10^2$	-
3597	24	7 dias	$\geq 10^5$	$0,58 \times 10^2$	-
	48		$\geq 10^5$	$0,25 \times 10^2$	-

Tabela 4. Suscetibilidade de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis frente a diferentes doses de irradiação gama (kGy) em ovos SPF submetidos a contaminação vertical

Cepa	Doses (kGy)		
	1.0	1.5	3.0
92	$\geq 10^5$	$6,2 \times 10^2$	$\geq 10^5$
2682	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	-
2689	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$0,05 \times 10^2$
3305	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
3597	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$2,76 \times 10^2$

4.3. Avaliação das Características Fenotípicas

Um total de 140 isolados correspondentes às diferentes doses de irradiação e período de isolamento foram analisados de modo a detectar variações em suas características fenotípicas tais como morfologia colonial, perfis metabólicos e de susceptibilidade antimicrobiana (Tabela 5).

Tabela 5. Distribuição dos isolados de *Salmonella* ser. Enteritidis recuperados, de acordo com o período e dose de irradiação

Doses kGy	Período pós-irradiação				Total
	N° de isolados				
	24 h	48 h	96 h	7 dias	
1,0	14	18	19	29	80
1,5	2	7	8	21	38
3,0		1	4	12	17
5,0			1	2	3
10,0			1	1	2
Total	16	26	33	65	140

4.3.1. Características coloniais

Foram observadas variações no tamanho e morfologia colonial em agar Enterico Hektoen, cujas características são evidenciadas nas Figuras 7a e 7b. Independente da dose e período do isolamento, alterações como colônias grandes, mucoides ou opacas, borda e superfície irregulares, crescimento confluyente, plano, firmemente aderido a superfície do meio, crescimento de colônias fermentadoras (tonalidade amarela a salmão) e ausência na produção de H₂S.

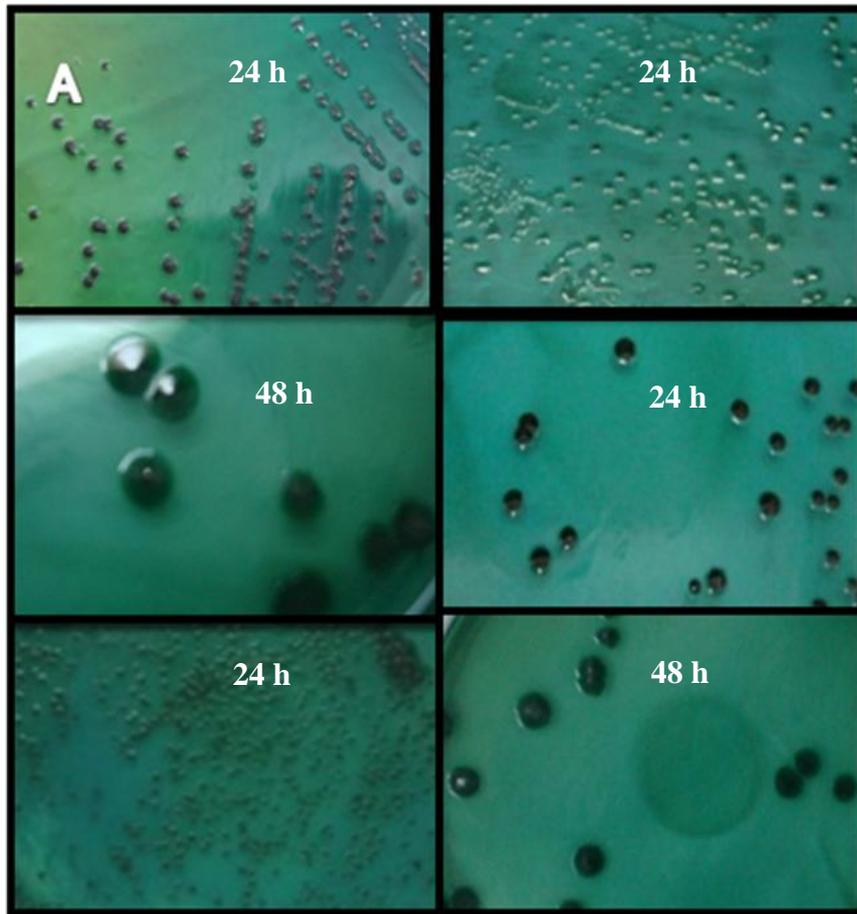


Figura 7a. Características das colônias de *Salmonella ser. Enteritidis* pós-irradiação

Crescimento de 24h/48h em Agar Entérico Hektoen
A- crescimento da cepa controle não irradiada

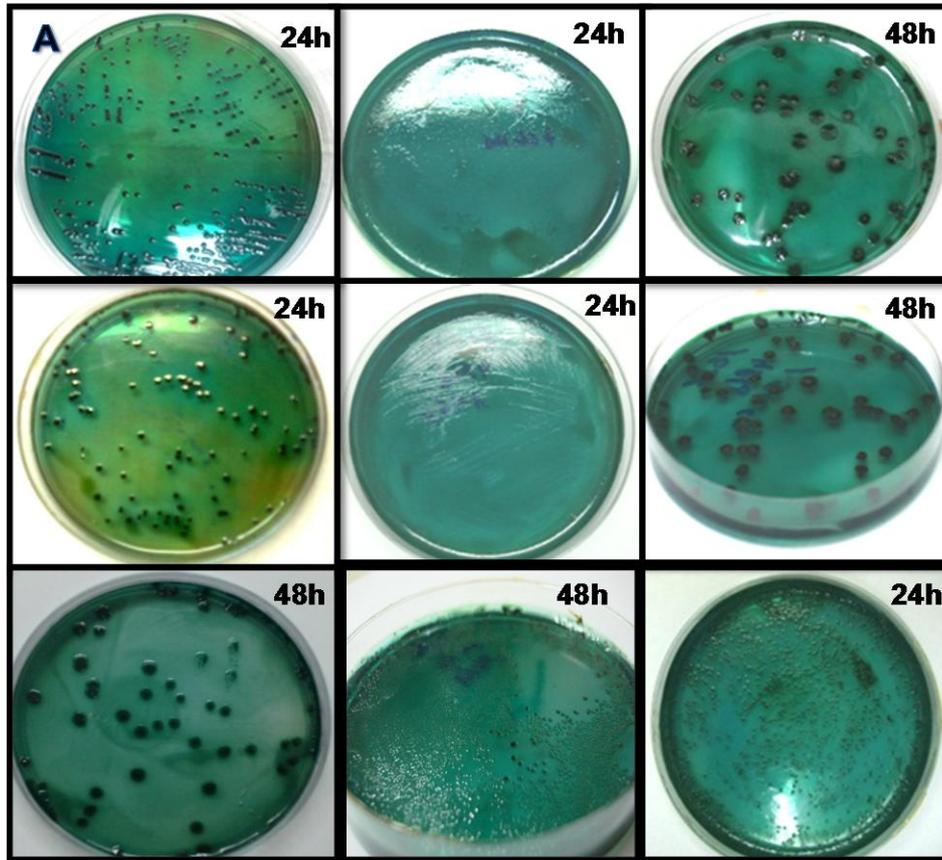


Figura 7b. Características das colônias de *Salmonella* ser. Enteritidis pós - irradiação

crescimento de 24h /48h em Agar Entérico Hektoen
A- crescimento da cepa controle não irradiada



Figura 8. Característica de colônia de *Salmonella* ser. Enteritidis pós-irradiação
Cepa 3305 Lactose positiva (3kGy)

4.3.2. Características bioquímicas

Os testes bioquímicos confirmatórios foram realizados em 115 isolados recuperados pós-irradiação vertical e 25 do segundo ensaio (horizontal e vertical), totalizando 140 subculturas.

Entre as alterações bioquímicas, destacaram-se a fermentação da lactose (4 isolados) e da sacarose (1), não utilização do citrato como única fonte de carbono (4), ausência de produção de sulfeto de hidrogênio (2) e lisina descarboxilase negativa (4), independente da dose e tempo pós-irradiação (Tabela 6) e uma subcultura com perda de mobilidade (cepa 93), não havendo relação com a dose de irradiação empregada.

Tabela 6. Alterações fenotípicas observadas nas cepas de Salmonella ser. Enteritidis pós-irradiação

Cepas originais	Alterações fenotípicas	Nº de isolados	Doses (kGy)	Via de Contaminação
71	H ₂ S –	2	0,8 e 1,0	Vertical
	Citrato -	2		
92	Lisina negativo	2	1,5 e 3,0	Horizontal
93	Imóvel	1	1,0	Vertical
231	Citrato -	2	1,0 e 1,5	Vertical
2682	Sacarose +	1	1,0	Horizontal
	Lisina negativo	1	3,0	Horizontal
3305	Lactose +	3	1,0, 1,5 e 3,0	Vertical
	Lactose +	1	1,0	Horizontal
3597	Lisina negativo	1	1,0	Horizontal

4.3.3. Confirmação da integridade antigênica

Todos os isolados recuperados pós-irradiação tiveram seu perfil antigênico confirmado, com exceção de um, no qual a análise antigênica não confirmou a aglutinação com anti-soros flagelares (HG e Hm).

4.3.4. Fagotipagem

A avaliação do perfil das cepas pós-irradiação permitiu detectar conversão do fagotipo PT4 a PT12 somente em uma cepa recuperada após ter sido submetida a irradiação de 5kGy (cepa 92) cujo resultado foi confirmado no Health Canada. As demais mantiveram o seu perfil original.

4.3.5. Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos

Nesta etapa, 115 isolados recuperados pós-irradiação foram testados e seus perfis de suscetibilidade aos antimicrobianos comparados aos das cepas originais, utilizadas para a inoculação dos ovos (contaminação vertical).

A análise dos perfis de resistência antimicrobiana revelou perda da capacidade de resistência para antibióticos β -lactâmicos (conversão R \rightarrow S) na totalidade dos isolados correspondentes a sete cepas e uma cepa (71) para fluoroquinolona (CIP), independente da dose de irradiação (Tabela 7).

Além desses (dados não mostrados em tabela), destacou-se conversão R \rightarrow S na totalidade dos isolados referentes a duas cepas (71 e 8400) para SXT e naqueles correspondentes a uma cepa, para CHL (cepa 3597), NIT (cepa 92), TCY (cepa 1862) e GEN (cepa 3305). Adicionalmente, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos realizado com a cepa 92 resultante da irradiação a 10 kGy, evidenciou conversão R \rightarrow S para CIP enquanto manteve seu perfil de resistência para o ácido nalidíxico.

Tabela 7. Suscetibilidade aos antimicrobianos de *Salmonella* ser. Enteritidis antes e após a irradiação

Cepa N ^o _a	Testadas ^b	Penicilinas							
		Cefalosporinas I, II ^c		Cefalosporinas III ^d		Quinolonas ^e		Fluoroquinolonas ^f	
		Irradiação		Irradiação		Irradiação		Irradiação	
		Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após	Antes	Após
71	3	+	-	-	-	+	+	+	-
92	9	-	-	-	-	+	+	+	+
93	8	-	-	-	-	+	+	-	-
94	8	-	-	-	-	+	+	+	+
95	5	-	-	-	-	+	+	+	+
231	5	+	-	+	-	+	+	+	+
813	2	-	-	-	-	+	+	-	-
1683	7	+	-	-	-	+	+	-	-
1686	6	+	-	-	-	+	+	-	-
1862	4	+	-	+	-	-	-	-	-
3305	10	+	-	+	-	+	+	-	-
3411	4	+	+	+	+	+	+	-	-
3597	11	+	+	-	-	+	+	-	-
5452	4	+	-	+	-	+	+	-	-
7951	4	-	-	-	-	+	+	-	-
8155	9	+	+	-	-	+	+	+	+
8400	4	-	-	-	-	+	+	-	-
10483	5	-	-	-	-	+	+	-	-
11289	3	-	-	-	-	-	-	-	-
11318	4	-	-	-	-	+	+	-	-

^a cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis pertencentes a coleção do Laboratório de Enterobacterias/IOC/FIOCRUZ

^b Total de amostras recuperadas e testadas por cepa pós-irradiação

^c Ampicilina, Cefalotina, Cefoxitina

^d Ceftriaxona

^e Ácido nalidíxico

^f Ciprofloxacina

+ resistente - sensível

4.3.6. Avaliação da produção de biofilme

Os resultados revelaram produção de biofilme por 6 (60%) das 10 cepas não irradiadas (originais), consideradas fracas ou moderadas produtoras. Por outro lado, dos 25 isolados recuperados das cepas irradiadas, 18 produziram biofilme em diferentes graus, destacando-se a amostra 8155 (1,0 kGy), como forte produtora de biofilme (Tabela 8, Figura 9). Ressalta-se a produção de biofilme em isolados recuperados pós-irradiação, oriundos de cepas negativas (cepas 93, 231 e 8155).

Tabela 8. Produção de biofilme por *Salmonella ser. Enteritidis* entre as cepas analisadas, antes e após a irradiação

Cepa	Original	Produção de Biofilme Pós-Irradiação				
		1 kGy	1,5 kGy	3 kGy	5 kGy	10 kGy
71	-	-				
92	+	+	+	+	++	+
93	-	-	-	+	-	
231	-	++				
3305	+	+	+	+		
3597	+	+	+	+	+	
5452	++	+				
7951	+	+				
8155	-	+++	+	-		
10483	+	+	+			

+++ forte ($OD_{570} > 2,0$)

++ medio ($OD_{570} 1,0 - 2,0$)

+ fraco (OD_{570}

$\geq 0,5 - < 1,0$) produtor de biofilme

- ($OD_{570} \leq 0,5$) não produtor de biofilme

média do controle positivo: ++ ($OD_{570} 1,0 - 2,0$)

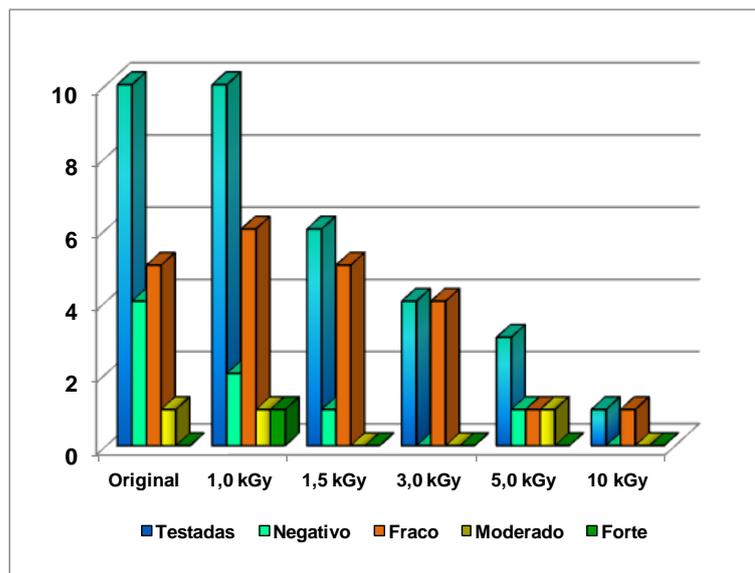


Figura 9. Distribuição dos 35 isolados de *Salmonella* ser. Enteritidis quanto a produção de biofilme

4.4. Alterações Genótipicas observadas nas Cepas Pós-Irradiação

4.4.1. Caracterização molecular da resistência antimicrobiana

Tendo por base os resultados obtidos no teste de suscetibilidade aos antimicrobianos, foram selecionadas um total de 34 amostras, sendo 11 cepas (não irradiadas) e 23 recuperadas pós-irradiação. Entre estas, quatro resistentes a CRO, 32 a NAL, 11 a CIP e duas sensíveis aos três marcadores (Tabela 9), tendo sido pesquisados os genes *bla_{CTX}*, *gyrA* e *gyrB*.

O gene *bla_{CTX}* foi detectado em uma cepa (cepa 92) e sua respectiva subcultura (cepa 92 – 1 kGy) entretanto o maior número de detecção foi observado para os genes *gyrA* e *gyrB*, em 9 e 10 cepas, respectivamente (Tabela 10, Figura 10).

Excetuando-se as 11 amostras em que houve a caracterização dos genes de resistência, as demais (23 isolados) apresentaram-se negativas.

Tabela 9. Amostras selecionadas para a detecção de genes de resistência através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Cepa	Original/ Irradiada	TSA			Cepa	Original/ Irradiada	TSA		
		CRO	NAL	CIP			CRO	NAL	CIP
92	Original	S	R	R	3597	3,0 kGy	S	R	S
92	1,0 kGy	S	R	R	3597	5,0 kGy	S	R	S
92	1,5 kGy	S	R	R	10483	Original	S	R	S
92	3,0 kGy	S	R	R	10483	1,0 kGy	S	R	S
92	5,0 kGy	S	R	R	10483	1,5 kGy	S	R	S
92	10 kGy	S	R	S	93	Original	S	R	S
3305	Original	R	R	S	93	1,5 kGy	S	R	S
3305	1,0 kGy	S	R	S	93	3,0 kGy	S	R	S
3305	1,5 kGy	S	R	S	11318	Original	S	R	S
3305	3,0 kGy	S	R	S	11318	1,0 kGy	S	R	S
8155	Original	S	R	R	11289	Original	S	S	S
8155	1,0 kGy	S	R	R	11289	1,0 kGy	S	S	S
8155	1,5 kGy	S	R	R	95	Original	S	R	R
8155	3,0 kGy	S	R	R	95	1,0 kGy	S	R	R
3597	Original	S	R	S	3411	Original	R	R	S
3597	1,0 kGy	S	R	S	3411	1,0 kGy	R	R	S
3597	1,5kGy	S	R	S	5452	Original	R	R	S

S – sensível R – resistente

Tabela 10. Genes de resistência a ceftriaxona e quinolonas detectados nas cepas de *Salmonella ser. Enteritidis* antes e após a irradiação

Cepa	Dose	Suscetibilidade x Genes de resistência					
		CRO	<i>bla_{CTX}</i>	NAL	CIP	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>
92	Original	S	+	R	R	+	+
92	1kGy	S	+	R	R	-	-
92	3kGy	S	-	R	R	+	+
92	5kGy	S	-	R	R	+	+
92	10kGy	S	-	R	R	+	+
8155	Original	S	-	R	R	+	+
3597	1kGy	S	-	R	S	-	+
11318	Original	S	-	R	S	+	+
11318	1kGy	S	-	R	S	+	+
11289	1kGy	S	-	S	S	+	+
95	1kGy	S	-	R	R	+	+

S – sensível R – resistente

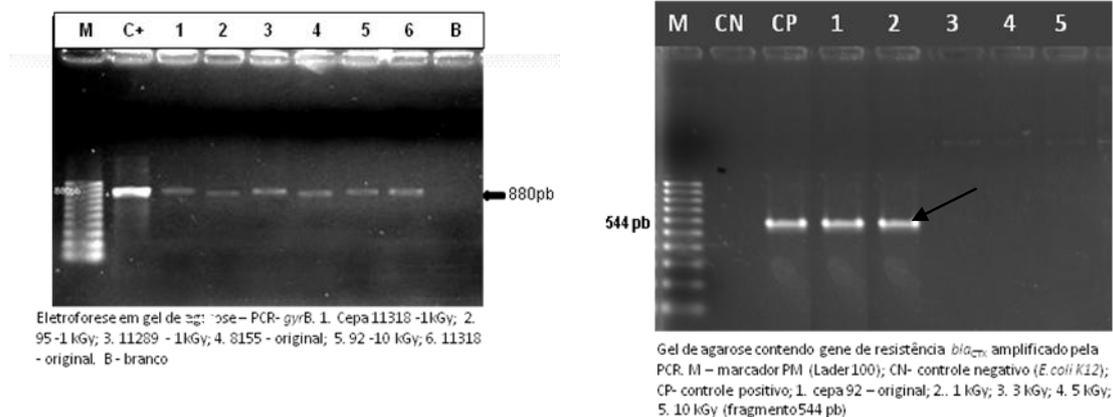


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose para caracterização dos genes *gyrB* e *bla_{CTX}* em *Salmonella* ser. Enteritidis antes e após irradiação

4.4.2. Caracterização Molecular da Virulência

Para a detecção de genes de virulência foram analisadas três cepas que apresentaram resistência a irradiação gama, incluindo suas respectivas sub-culturas resultantes das diferentes doses de irradiação. O critério de escolha incluiu aquelas representativas de resistência até 3,0 kGy (cepa 3305), 5 kGy (cepa 3597) e a 10,0 kGy (cepa 92).

Foram pesquisados um total de 10 genes (Tabela 11) sendo quatro plasmidiais e cromossômicos (*slyA*, *pho P/Q*, *stn*, *spvC*) e os demais genes localizados em Ilhas de Patogenicidade, SPI 1 (*invE/A*, *orgA*, *sipA*, *hila*), SPI 3 (*mgtC*) e SPI 4 (*siiE*).

Os resultados revelaram deleção de genes nas amostras pós-irradiação, sendo mais estável na cepa 3305 (Figura 11), mais visível na cepa 3597 (Figura 12). No entanto assinalou-se que as subculturas da cepa 92 sobreviventes às diferentes doses de irradiação, expressaram maior número de genes, quando comparadas a cultura original (Figura 13).

A variedade dos genes detectados nas cepas analisadas está representada na figura 14.

Tabela 11. Genes de virulência detectados nas cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis e respectivas subculturas

Cepas e sub-culturas	Genes cromossômicos e plasmidiais				SPI 1				SPI 3	SPI 4
	<i>sly A</i>	<i>pho P/Q</i>	<i>stn</i>	<i>spv C</i>	<i>inv E/A</i>	<i>org A</i>	<i>sip A</i>	<i>hil A</i>	<i>mgt C</i>	<i>sii E</i>
3305	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1kGy	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1,5 kGy lac(-)	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1,5 kGy lac(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 kGy lac(-)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 kGy lac(+)	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>sly A</i>	<i>pho P/Q</i>	<i>stn</i>	<i>spv C</i>	<i>inv E/A</i>	<i>org A</i>	<i>sip A</i>	<i>hil A</i>	<i>mgt C</i>	<i>sii E</i>
3597	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
1kGy	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
1.5 kGy	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
3 kGy	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+
5 kGy	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
	<i>sly A</i>	<i>pho P/Q</i>	<i>stn</i>	<i>spv C</i>	<i>inv E/A</i>	<i>org A</i>	<i>sip A</i>	<i>hil A</i>	<i>mgt C</i>	<i>sii E</i>
92	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
1 kGy	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
1,5 kGy	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
1,5 kGy 7 dias	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-
3 kGy	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
5 kGy	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
10 kGy	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

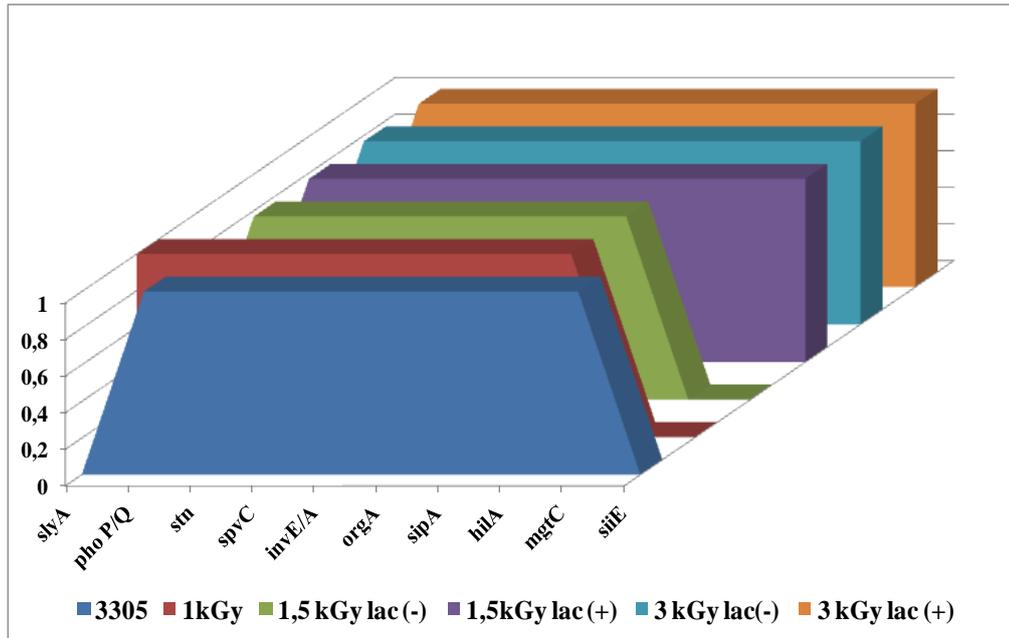


Figura 11. Representação gráfica dos genes de virulência detectados na cepa 3305 de *Salmonella* ser. Enteritidis e suas subculturas resultantes de diferentes doses de irradiação

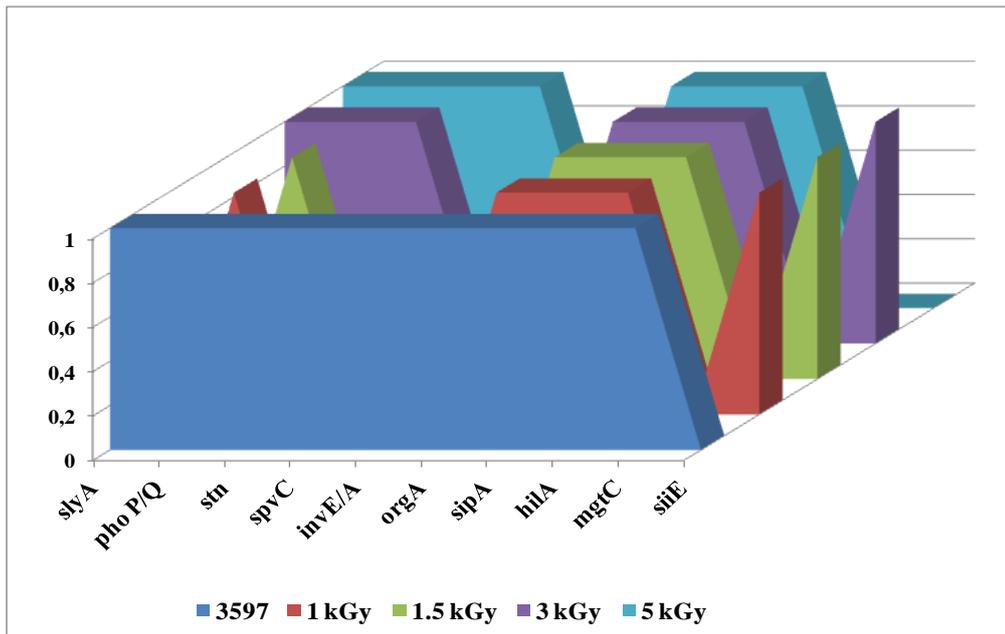


Figura 12. Representação gráfica dos genes de virulência detectados na cepa 3597 de *Salmonella* ser. Enteritidis e suas subculturas resultantes de diferentes doses de irradiação

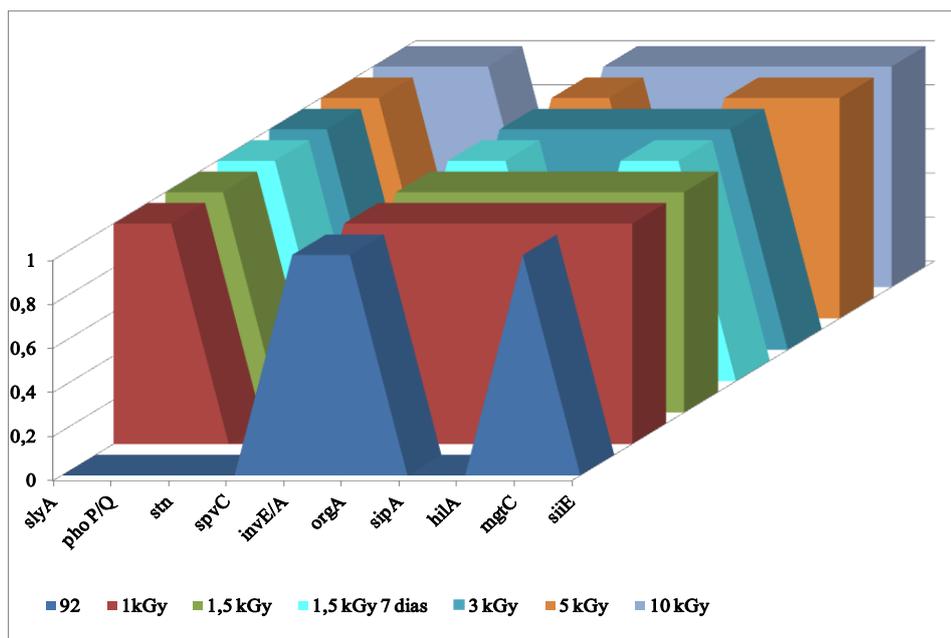
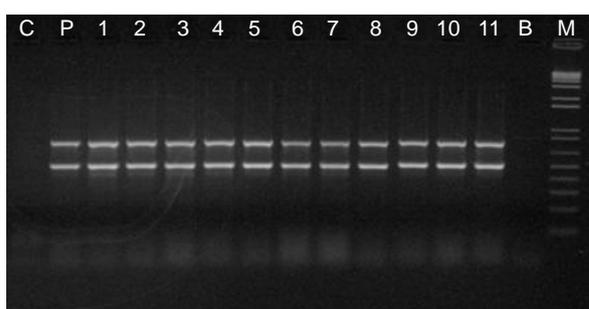
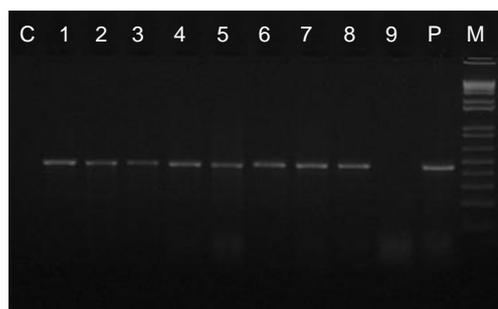


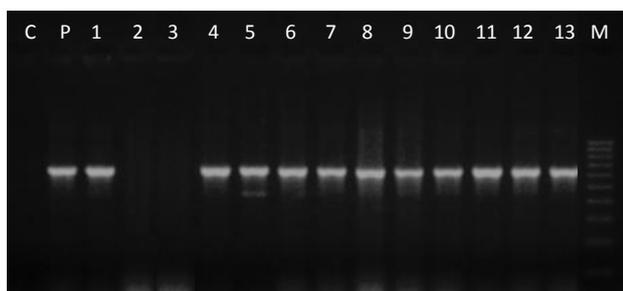
Figura 13. Representação gráfica dos genes de virulência detectados na cepa 92 de *Salmonella* ser. Enteritidis e suas subculturas resultantes de diferentes doses de irradiação



Amplificação por PCR para caracterização de *hlyA* e *sipA* em *Salmonella* ser. Enteritidis. C- controle negativo (*E. coli* K12); P- controle positivo. 1- cepa 3305-original; 2- 1,0 kGy; 3- 1,5kGy (lac-); 4-1,5 kGy (lac+); 5- 3,0kGy (lac-); 6- 3,0kGy(lac+); 7- 3597-original; 8- 1,0kGy; 9-1,5kGy; 10- 3kGy; 11- 5 kGy) B- branco; M- marcador PM;



Amplificação por PCR para caracterização de *invE/A* em *Salmonella* ser. Enteritidis. C- controle negativo (*E. coli* K12); 1- cepa 92-original; 2- 1,0kGy; 3- 1,5kGy; 4-1,5kGy-7 dias; 5-3,0kGy; 6-5,0kGy; 7- 10kGy; 8- cepa 3597-original; 9- 3597-1,0kGy negativo. P- controle positivo; M- marcador PM;



Amplificação por PCR para caracterização do gene *mgcC* *Salmonella* ser. Enteritidis. C- controle negativo (*E. coli* K12); P- controle positivo. 1- cepa 3305- original; 2- 3305-1kGy; 3- 3305-1,5kGy (lac-); 4- 1,5kGy (lac+); 5- 3kGy (lac-); 6- 3kGy (lac+); 7- cepa 92-original; 8- 1,0kGy; 9- 1,5kGy; 10- 1,5kGy (7 dias); 11- 3kGy; 12- 5kGy; 13- 10kGy; M- marcador PM;

Figura 14. Eletroforese em gel de agarose para caracterização de genes de virulência nas cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis (3305, 3597 e 92) antes e após irradiação.

4.4.3. Relacionamento clonal através da PFGE

A análise do polimorfismo de macrorrestrrição obtido pela enzima *Xba*I cujos géis foram analisados usando BioNumerics 4.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) tendo revelado baixa diversidade nos perfis gerados com *Xba*I por PFGE pela totalidade das amostras, compartilhando similaridade em torno de 98% a 100% entre todas as cepas recuperadas a partir das diferentes doses de irradiação, conforme exemplificado na Figura 15.

Em face aos resultados obtidos e usando o protocolo do PulseNet EUA desenvolvido para *Salmonella*, foi empregada a enzima *Bln*I para formação de fragmentos distintos. A análise efetivada na totalidade das bandas para cada uma das enzimas empregadas, com tamanhos entre 33 kb e 1.135 kb foram incluídos na interpretação dos padrões de PFGE, para avaliação dos padrões com diferença em uma ou mais bandas o qual poderia ser atribuído como novo tipo de PFGE, entretanto não foi observada a presença de fragmentos que pudessem ser reconhecidos como resultantes da atividade desta enzima conforme exemplificado na Figura 16.

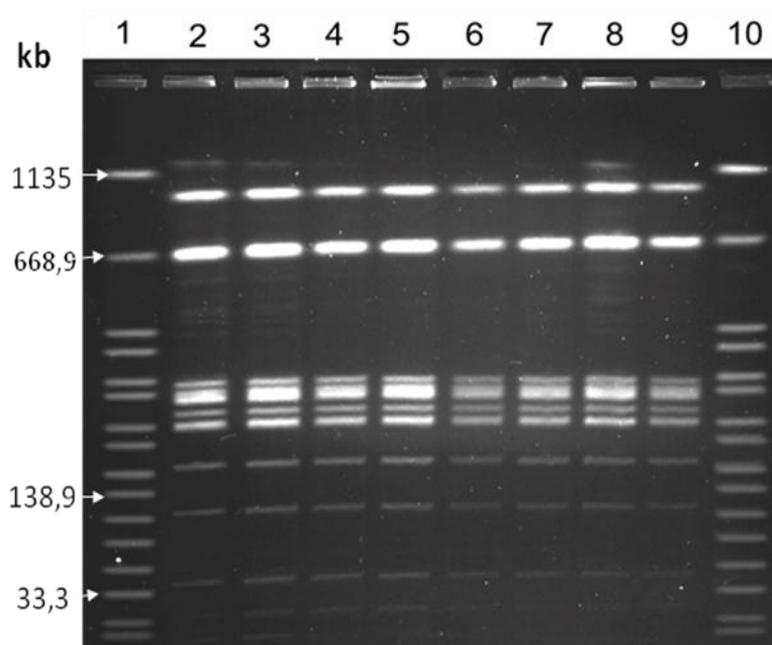


Figura 15. Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis, antes e após irradiação, submetidas à restrição com a enzima *Xba*I

2 - cepa 92- original; 3 - 1,0 kGy; 4 - 1,5 kGy; 5 - 3,0 kGy; 6 - cepa 2679 - original; 7 - 1,0 kGy; 8 - 1,5 kGy; 9 - 3,0 kGy; 1 e 10 - *Salmonella* ser. Braenderup H9812 (marcador de peso molecular)

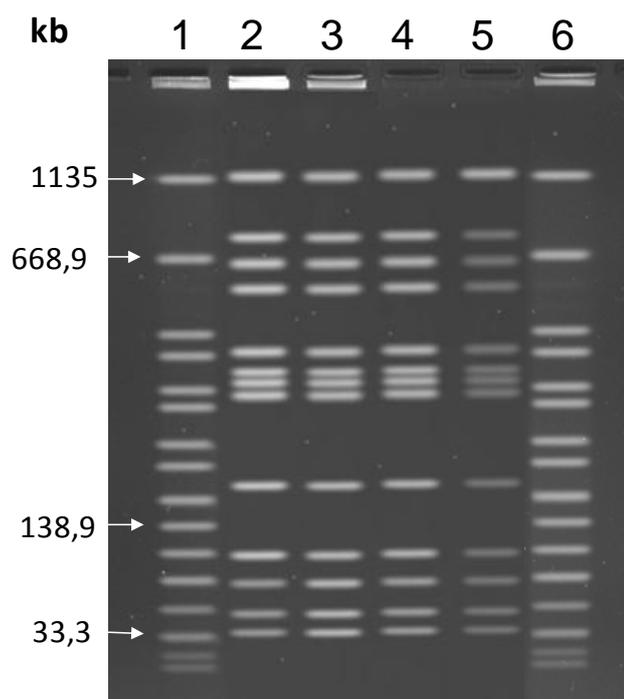


Figura 16. Gel de Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis, antes e após irradiação, submetidas à restrição com a enzima *BlnI*

2 - cepa 92- original; 3 - 1,0 kGy; 4 - 1,5 kGy; 5 - 3,0 kGy; 1 e 6 - *Salmonella* ser. Braenderup H9812 (marcador de peso molecular)

5. DISCUSSÃO

A análise visual das características dos ovos irradiados revelou uma redução da viscosidade da clara independente das doses de radiação gama. Foi verificado ainda que doses $\geq 1,0$ kGy determinaram mudanças de cor na gema (amarelo pálido), tornando-a mais espessa e de fácil ruptura, sugerindo que a irradiação enfraquece a membrana da gema, facilitando assim o derramamento do seu conteúdo. Esta alteração de cor pode estar relacionada com a destruição dos carotenóides da gema (HUANG et al., 1997). Além disso, a clara dos ovos apresentou uma cor amarela turva, especialmente naqueles ovos armazenados em temperatura ambiente e testados sete dias após a irradiação.

Observações semelhantes foram relatadas por Mészáros; Horti; Farkas (2006); Min et al. (2005); Ma (1996) e Tellez et al. (1995). Segundo Ma et al. (1996), a perda da viscosidade na clara irradiada estaria relacionada com a quebra de proteína. Ball e Gardner (1968) relataram severo dano às proteínas da clara ao irradiarem ovos com até 8,64 kGy. A viscosidade da clara foi reduzida com o aumento da dose de radiação utilizada e na dose citada houve perda de 50% do valor original. Ainda Pinto et al. (2004) irradiaram ovos com 0,5 a 5 kGy e verificaram que, conforme a dose era maior, a viscosidade da gema aumentava e a da clara diminuía. Com 5 kGy, a cor da gema ficou “pálida”, enquanto a clara adquiriu cor amarela turva. Não houve alteração na proteína ou nos fosfolipídios da gema, independente da dose.

De acordo com o (2005a) todas essas alterações fazem com que os ovos pareçam mais velhos e, assim, às vezes inadequados para o preparo de alguns pratos.

Em 2000, o FDA aprovou o uso de radiação com dose de 3 kGy para reduzir a contaminação interna de ovos. No entanto, esta dose não é suficiente para reduzir a carga microbiana interna por 5 unidades log e, portanto, não pode garantir a segurança de ovo. Embora a radiação gama efetivamente inativa *Salmonella* ser. Enteritidis em ovos, tem sido reportado que este tratamento afeta drasticamente a qualidade do ovo (MA, 1996).

Enquanto outros estudos indicam estudos indicam que a irradiação pode eliminar os patógenos de ovos sem afetar negativamente a qualidade dos mesmos (FDA, 2000; SERRANO et al., 1997; WHO, 1981).

De acordo com o FDA (2000) "há pouca mudança nos níveis de ácidos graxos, na estrutura, digestibilidade ou valor biológico das proteínas, quando ovos em casca são tratados com radiação ionizante até 3 kGy e que a irradiação pode alterar um pouco a viscosidade dos ovos, tornando o branco da clara mais leitoso e fluido. Apontou ainda que os minerais não foram afetados pela irradiação, no entanto, os níveis de algumas vitaminas podem ser reduzidos de acordo com o aumento das doses, por exemplo, as concentrações de vitamina A, porém nem todas as perdas de vitamina foram significativas. Por outro lado essa perda poderia ser compensada pela ingestão de outros alimentos.

Pesquisas no Reino Unido revelaram que ovos congelados e desidratados podem ser irradiados com doses de até 5 kGy para proporcionar proteção higiênica sem perda de qualidade (IAEA, 1999). Em estudo mais recente, uma dose de 2 kGy foi considerada como mais adequada para a inativação de *Salmonella* no ovo em pó, preservando as propriedades tecnológicas e sensoriais do produto.

HUANG et al. (1997) relataram que a irradiação de 2,5 kGy não causa mudanças substanciais nas propriedades químicas, físicas e funcionais, como a cor, integridade e

solubilidade de proteínas ou capacidade de emulsão da gema de ovo líquida congelada. Ainda de acordo com Serrano et al. (1997), a dose de 1,5 kGy não afetou a cor e as características térmicas de ovos em casca e ovos inteiros líquidos..

Alguns autores (GURTLER; CONNER. 2009; MA, 1996) sugeriram que importantes propriedades funcionais de ovos e produtos de ovos, poderiam ser melhoradas com baixa dose de irradiação (1 a 3 kGy). Wong et al. (1996) observaram que a clara do ovo líquido irradiado tinha maior estabilidade do poder espumante e da viscosidade do que a clara de ovo pasteurizada. Estes efeitos podem ser úteis, por exemplo, para prolongar a vida de prateleira deste alimento.

O CDC (2005a) afirmou que a irradiação de alimentos é uma tecnologia promissora com grande potencial para a prevenção de muitas e importantes doenças transmitidas pelos alimentos e que a irradiação com doses adequadas, não prejudica o valor nutricional de alimentos nem o torna impróprio para consumo.

No presente estudo, a susceptibilidade de cada cepa de *Salmonella* foi calculada com base nas curvas de sobrevivência às diferentes doses de radiação, cuja sensibilidade às doses de 1,5, 3,0 e 5,0 kGy foi variável entre as cepas, destacando-se acentuada redução da população bacteriana com as doses de 3 e 5 kGy, por outro lado, não houve recuperação de *Salmonella* nos ovos analisados no dia da irradiação.

A ausência de bactérias no dia da inoculação e irradiação também foi observada por Murase; Holt e Gast (2005). Este “crescimento negativo temporário” pode ser uma consequência do estresse causado pela irradiação. Além disso, a possível presença de anticorpos anti-*Salmonella* ser. Enteritidis foi descartada pelo fato de que apenas ovos SPF foram utilizados no presente estudo. Em contrapartida este microorganismo foi recuperado a partir dos ovos controle positivos (inoculados e não irradiados) no dia da inoculação (“dia zero” do experimento).

Embora vários estudos relacionados com a aplicação de radiação gama em ovos e seus produtos tenham sido publicados, dados específicos relacionados a aplicação desta tecnologia para ovos *in natura* são escassos. No presente estudo considerando o efeito das diferentes doses de radiação gama sobre a população de *Salmonella* ser. Enteritidis nos ovos, verificou-se que a dose de 1,5 kGy não inibiu 60% das cepas. Por outro lado, as doses de 3 kGy e 5 kGy foram suficientes para reduzir ou eliminar *Salmonella* ser. Enteritidis, resultando em 35% e 10% de sobreviventes, respectivamente, sendo portanto, consideradas suficientes para pasteurização e higiene, permitindo o controle efetivo da *Salmonella* em ovos. Tais doses poderiam reduzir significativamente o risco de infecções associadas com ovos contaminados com *Salmonella* ser. Enteritidis até que este patógeno seja erradicado das matrizes.

Resultados semelhantes foram obtidos por Thornley (1963) em ovos inteiros congelados e na clara do ovo. Tellez et al. (1995) também avaliaram a sobrevivência da *Salmonella* ser. Enteritidis inoculada em ovos frescos (10^8 UFC) após o uso de irradiação (1, 2 e 3 kGy). Nas doses de irradiação de 2 e 3 kGy não foram detectadas células viáveis na casca e membranas internas do ovo.

Narvaiz et al. (1992) apontaram a eficácia de doses superiores a 2 kGy no controle de *Salmonella* e outros patógenos presentes na gema. Serrano et al. (1997) sugerem a dose de 1,5 kGy como efetiva para reduzir cerca de 4 ciclos log a população de *Salmonella* ser. Enteritidis em ovos inteiros e ovos líquidos. Cabo Verde; Tenreiro e Botelho (2004) e Mészáros; Horti e Farkas (2006) observaram que uma dose de 1,5 kGy foi eficaz para pasteurização e sanitização dos ovos inteiros e produtos de ovos.

Froehlich (2004) obteve uma redução de 5 ciclos log da população de *Salmonella* ser. Enteritidis em ovo líquido, ovo congelado, gema em pó, clara em pó e ovo em pó através da irradiação com doses de 2,0; 3,0; 3,5; 3,0 e 3,5 kGy respectivamente.

Em uma segunda etapa, na presente investigação, foram identificadas e avaliadas a

sobrevivência e migração de *Salmonella* ser. Enteritidis, considerando as duas vias de contaminação do ovo (vertical e horizontal), bem como os efeitos da irradiação gama sobre a população bacteriana. Os resultados evidenciaram sua presença ($\geq 10^5$ UFC/mL) na gema dos ovos controle, já nas primeiras 24 horas após contaminação da casca, da mesma forma que nos ovos irradiados e testados após sete dias de estocagem em temperatura ambiente do laboratório ($\pm 25^\circ\text{C}$).

Estudos têm evidenciado que a gema é o principal local de crescimento bacteriano podendo atingir níveis elevados, quando comparada com a clara do ovo (CHEN; THESMAR, 2008; GAST et al., 2008). Padrões de crescimento de *Salmonella* inoculada artificialmente muitas vezes não coincidem com aqueles observados em ovos naturalmente contaminados, sugerindo que a invasão da gema e subsequente crescimento ocorre rapidamente em quase todos os ovos inoculados diferindo daqueles naturalmente contaminados (OKAMURA et al., 2001). Acredita-se que ocorrem principalmente no albúmen, normalmente a um local próximo a membrana vitelina (GAST et al., 2007).

A penetração da casca de ovos por *Salmonella* spp. tem sido relatada em condições experimentais por muitos autores (GAST et al., 2006). A membrana da casca é reconhecida como a principal barreira física à infecção microbiana do conteúdo dos ovos (HARTUNG; STADELMAN, 1962). Board (1966) relatou uma diferença de 20 dias entre o momento em que o microorganismo penetrou na casca e o grande número de organismos encontrados no conteúdo do ovo. Este aspecto foi evidenciado no presente estudo já 24 horas após a contaminação da casca do ovo. É provável que um dos fatores que possa contribuir para este resultado seja a temperatura de manutenção dos ovos ($\approx 25^\circ\text{C}$), a qual propicia o crescimento microbiano, aspecto não apontado pela avaliação realizada por Board (1966)

Entretanto, discrepâncias na frequência de contaminação (DE BUCK et al., 2004) bem como em relação aos sorovares isolados a partir de casca e do conteúdo dos ovos fornecem fortes evidências que a penetração não ocorre facilmente na prática (DE BUCK et al., 2004; HUMPHREY, 1994).

O ovo representa um meio propício para o desenvolvimento de microorganismos e são necessárias diversas barreiras intrínsecas de defesa contra bactérias (NASCIMENTO; SALLE, 2003). A cutícula é uma cobertura glicoprotéica, transparente e delgada que cobre por curto período a superfície externa do ovo, selando 99% dos poros. A casca e suas membranas constituem uma barreira física rígida que limita a penetração de bactérias, enquanto o albúmen possui uma série de substâncias antimicrobianas como lisozima, coalbumina, avidina, riboflavina, apoproteína, etc., que impedem a multiplicação e o deslocamento bacteriano (SOUZA-SOARES; SIEWERDT, 2005).

Vários fatores podem influenciar a penetração de um patógeno nos componentes do ovo. Fatores a ele relacionados como porosidade, qualidade da cutícula, espessura da casca, a presença de rachadura bem como fatores extrínsecos, tais como a cepa e a concentração de bactérias, temperatura, umidade e presença de matéria orgânica (MESSENS et al., 2005; CHEN et al., 2005).

No presente estudo, os resultados obtidos nos ovos irradiados 24 h pós- contaminação horizontal revelaram maior suscetibilidade a dose de 3 kGy ($P < 0,05$) quando comparados àqueles irradiados 48h após a contaminação ($P > 0,05$). Pode-se admitir a possibilidade de que no período de 24h a população bacteriana na gema ainda não tenha atingido níveis elevados. Este aspecto é aplicado aos ovos inoculados diretamente na gema.

Estudos relatam que a clara é o principal local de contaminação (METHNER et al., 1995; HUMPHREY et al., 1991; GAST; BEARD, 1990), enquanto Gast e Holt (2000) e Gast et al., (2002) observaram uma maior incidência de contaminação na gema. Neste ambiente, *Salmonella* cresce em nível de $\geq 10^6$ células, enquanto no albúmen, crescem em menor número (Gast e Holt, 2000), resultados reforçados pela investigação desenvolvida por Chen et al.,

(2005), os quais relatam que *Salmonella* ser. Enteritidis cresce lentamente e apenas de forma limitada no albúme.

É amplamente aceito que, além de um aumento inicial de *Salmonella* ser Enteritidis nos ovos, observado até 24 h pós-postura, nenhum crescimento significativo é visto na maioria destes ovos porém mudanças físicas na viscosidade do albúme e da permeabilidade da membrana da gema permitem o movimento bacteriano e, conseqüentemente, o acesso à gema (GAST; HOLT, 2001).

Um fator importante no controle do crescimento de *Salmonella* na clara é a limitação de ferro (CLAY; BOARD, 1991). É possível que durante o armazenamento, as mudanças que ocorrem no conteúdo dos ovos aumentem a disponibilidade de ferro, possivelmente, como resultado de alterações na integridade da membrana vitelina (BURLEY; VADEHRA, 1990), permitindo dessa forma o acesso ou a liberação de ferro na gema.

No momento da postura, o ovo passa através da cloaca, uma área altamente contaminada, o que muitas vezes é ilustrado por contaminação fecal visível da casca. Após a oviposição, a casca adquire a contaminação de todas as superfícies com as quais faz contato (BOARD; TRANTER, 1995). Enquanto está úmido e entrando em um ambiente com uma temperatura abaixo da temperatura do corpo da galinha, o ovo esfria imediatamente. Desta forma, o conteúdo do ovo se contrai e uma pressão negativa é estabelecida dentro do ovo, movendo assim, contaminantes através da casca (PADRON, 1990).

A presença de *Salmonella* na superfície da casca dos ovos pode representar um risco para a saúde pública, quer dando origem à contaminação da gema, após a penetração através da casca, ou como uma fonte de contaminação cruzada durante o preparo dos alimentos.

Apesar de uma ampla variedade de sorovares ser isolado da casca de ovos, apenas alguns são invasivos, principalmente *Salmonella* ser Enteritidis, a qual é capaz de colonizar os tecidos reprodutivos das aves, podendo estar presente no conteúdo de ovos intactos (OKAMURA et al., 2001).

De um modo geral, nas condições avaliadas nos dois experimentos deste estudo, os baixos níveis ou mesmo a ausência de isolamento nos ovos irradiados com as doses mais elevadas não pode garantir que *Salmonella* não esteja presente. Conseqüentemente não deve ser ignorada a possibilidade de que um reduzido número de células esteja em estado “viável mas não cultivável” (VNC).

Vários pesquisadores têm apontado que os processos geralmente considerados bactericidas podem levar ao estado de VNC, uma estratégia de sobrevivência que tem sido observada no ciclo de vida de algumas bactérias, resultante da exposição a condições de estresse, principalmente após a fase de crescimento estacionário (OLIVER; DAGHER; LINDEN, 2005).

A possível presença de VNC é importante porque, em condições mais favoráveis, essas células latentes podem reiniciar o seu metabolismo vegetativo normal (ressuscitação) e posteriormente, causar doença no hospedeiro (OLIVER; DAGHER; LINDEN, 2005). A indução do estado VNC em patógenos como *Salmonella*, que são expostos a condições de estresse, incluindo o processamento e os vários tipos de embalagens de alimentos empregados atualmente, é de grande preocupação para as instituições de saúde pública (ROWAN, 2004). Estas células não são identificáveis pelos métodos tradicionais de análise de alimentos, podem ressuscitar e manter a sua virulência, aumentando o potencial de risco para a infecção pela ingestão de alimentos que antes acreditava-se ser seguro para o consumo (BAFFONE et al., 2003). Conseqüentemente, o armazenamento apropriado, cozimento e procedimentos de manipulação são de extrema importância (GANTOIS et al., 2009).

A radiação ionizante é capaz de causar uma variedade de mudanças químicas nos microorganismos sendo o DNA o alvo mais crítico. Seu efeito biológico pode ser devido a interações diretas sobre as moléculas de ácido nucléico, o que dependendo do

comprometimento molecular, torna os microrganismos incapazes de crescer e reproduzir, ocasionando a morte celular (HALL; GIACCIA, 2006). Quanto às ações indiretas, a radiação interage com outros átomos ou moléculas presentes na célula, principalmente com as de água, produzindo radicais livres que nela se difundem, ocasionando danos ao DNA (WORCMAN-BARNINKA; LANDGRAF, 2003; FAO/IAEA/WHO, 1999).

Os microrganismos exibem respostas diferenciadas em relação à radiação ionizante. A resistência depende da natureza e intensidade dos danos diretos produzidos; da capacidade da célula em tolerar ou reparar esses danos, da espécie e número de microrganismos bem como do ambiente extracelular tais como, temperatura, atividade de água, pH, composição química do alimento e do ambiente (aeróbico ou anaeróbico) em que se encontram (FAO/IAEA/WHO, 1999).

Existem diferenças na resistência entre espécies bacterianas e entre cepas pertencentes a mesma espécie, embora a faixa de resistência entre estas seja geralmente limitada, o suficiente para ser ignorado para fins práticos (ANELLIS, et al. 1973). Diferenças na resistência à radiação dentro de grupos de organismos semelhantes estão relacionadas as diferenças em sua estrutura química e física, bem como na sua capacidade para se recuperar do dano causado pela irradiação. Consequentemente, os microrganismos que sobrevivem a irradiação provavelmente serão mais sensíveis às condições ambientais (temperatura, pH, nutrientes, inibidores, etc. que as células não irradiadas (THORNLEY, 1963). Entretanto segundo Landgraf (2002), estudos realizados dos anos de 1970 até o final da década de 1990 apontaram que tais fatores dependem do tipo de alimento, de seu conteúdo protéico ou lipídico.

As bactérias Gram-negativas são geralmente mais sensíveis que as Gram-positivas, e várias pesquisas apontam que, entre os patógenos Gram-negativos, *Salmonella* é a mais resistente. Desta forma, qualquer processo de irradiação capaz de destruir este microrganismo também eliminaria as outras Gram-negativas patogênicas (WORCMAN-BARNINKA; LANDGRAF, 2006; JAY, 2005).

A capacidade dos organismos para produzir fenótipos diferentes, sob diferentes condições ambientais (plasticidade fenotípica) tem sido objeto de estudos. A aparência e reações bioquímicas de *Salmonella* em meios de cultura seletivos é usualmente empregada para auxiliar na identificação. Neste estudo, foram evidenciadas alterações na morfologia e tamanho das colônias pós-irradiação, destacando-se inclusive, algumas subculturas fermentadoras em agar Hektoen. Licciardello et al (1969) não observaram alterações na aparência ou reações nas colônias de culturas rádio-resistentes e radiosensíveis, pertencentes a quatro sorovares de *Salmonella*, nos meios de agar Verde Brilhante, ágar *Salmonella-Shigella* Agar Mac Conkey. Por outro lado, em Agar Sulfito de Bismuto, foram notadas diferenças entre os sorotipos e até mesmo dentro de um sorotipo pertencentes a culturas radiosensíveis.

Embora o tratamento com irradiação não tenha causado uma acentuada mudança no padrão bioquímico global, onde a maioria das subculturas tiveram suas características originais conservadas, salienta-se no entanto que em 16 isolados, foram detectadas mudanças fenotípicas independente da dose e tempo pós-irradiação, entre estas, a perda da capacidade de utilizar o citrato como fonte única de carbono e da produção de gás sulfídrico. No entanto, apesar destas pequenas alterações, a identificação destas culturas como pertencentes ao gênero *Salmonella* ainda foi viável.

Estas alterações também foram observadas por Epps e Idziak (1970) e Davies e Sinskey (1973) em cepas irradiadas. Por outro lado, Erdman et al. (1961) não encontraram nenhuma alteração nas reações bioquímicas em uma cultura de *Salmonella* ser. Gallinarum submetida a 14 ciclos de irradiação. Licciardello et al. (1969), submetendo cepas padrões de quatro diferentes sorovares a repetidos ciclos de irradiação, detectaram falha de alguns sorotipos para crescer em meio de citrato de Simmons e para produção sulfeto de hidrogênio

em agar Ferro Açúcar Triplo. .

A fagotipagem é um método fenotípico tradicional para a subtipagem de *Salmonella* ser. Enteritidis em investigações epidemiológicas (ALTEKRUSE et al 1993; STANLEY et al 1992). Contudo, este método apresenta algumas limitações, entre estas, a impossibilidade de todas as cepas serem tipadas com os fagos conhecidos e a possibilidade de ocorrer a conversão entre os fagotipos (KOTTWITZ et al. 2010).

Várias pesquisas têm descrito diferentes tipos de conversões fagotipos. Frost et al. (1989) demonstraram a conversão de *Salmonella enterica* ser Enteritidis PT4 a PT24 com base na aquisição de um plasmídeo. Posteriormente, Threlfall et al. (1993) mostraram inter-relações entre PT4, PT7, PT7A, PT8, PT13, PT13a, PT23, PT24 e PT30 causadas pela perda ou aquisição de um plasmídeo *incN*. Posteriormente, Rankin e Platt (1995) demonstraram que fagotipos de *S. enterica* ser Enteritidis podem ser alterados como resultado da conversão pelos fagos temperados 1, 2, 3 e 6 do esquema de fagotipagem de Ward et al. (1987). No estudo, PT4, PT6, PT6a, PT13 e PT15 foram convertidos para PT8, PT4, PT7, PT13a e PT11, respectivamente; alguns novos padrões de lise também foram detectados. Um terceiro mecanismo de conversão de fagotipo foi relatado por Chart et al. (1989). Eles mostraram que a conversão de *Salmonella* ser. Enteritidis PT4 a PT7 estava envolvida na perda da camada lipopolissacarídica (LPS), com concomitante perda de virulência.

Hudson et al. (2001) com base nos resultados de eletroforese em gel de campo pulsado concluíram que diferentes fagotipos de *Salmonella* ser Enteritidis parecem ser geneticamente relacionados ou clonais; apontando a conversão do PT4 a PT8 por lisogenização com fago 2 do esquema de fagotipagem.

Outras pesquisas sobre a estabilidade dos fagotipos de *Salmonella* ser. Enteritidis relatam a conversão do PT4 para PT1, PT7, PT6a e PT24; do fagotipo PT23 para PT8 (ANDRIGHETO, 2006; ALCOCER, 2004; LACONCHA et al., 2000).

Considerando os resultados obtidos neste estudo em relação aos fagotipos, não foi possível determinar na literatura alguma relação molecular entre a conversão PT4 a PT12, detectada em uma cepa (92) após irradiação com a dose de 5kGy. Guard-Petter (1999) sugerem que as diferenças nos receptores podem ser resultantes da ocorrência do aumento de metilação. Contudo, estudos realizados por De Lappe et al. (2009) demonstraram que todo conjunto de fagos adsorvem na presença do antígeno lipopolissacarídeo O12, portanto, variação na adsorção não parece ser um fator importante na diferença de susceptibilidade de isolados de *Salmonella* ser Enteritidis a estes fagos. Por outro lado se considerarmos que a perda de região do lipopolissacarídeo é significativo em relação à emergência de PT7, é provável que alguns fagos empregados no painel não façam sua absorção nesta região, indicando a necessidade de uma avaliação mais abrangente para uma melhor compreensão quanto a este resultado obtido.

Resistência aos antimicrobianos entre patógenos humanos é de crescente preocupação, especialmente no que diz respeito ao potencial para o surgimento de cepas multirresistentes (GOLDING; MATTHEWS, 2004).

Do total de 20 cepas utilizadas neste experimento, 10 eram originalmente resistentes aos betalactâmicos, entre estas, cinco a ceftriaxona. Por outro lado, a maioria das cepas (90%) era resistente ao ácido nalidíxico e seis a ciprofloxacina. De acordo com Hooper (2001), as fluoroquinolonas (FQ), como ciprofloxacina, têm sido as drogas de escolha para o tratamento de infecções por *Salmonella* spp., porém, o aumento da resistência ao ácido nalidíxico, uma quinolona de primeira geração, é uma preocupação de saúde pública por estar relacionada com a redução na suscetibilidade a outros antimicrobianos desta classe e a possibilidade de emergência de cepas resistentes.

Considerando a alteração do padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos nas subculturas resistentes a irradiação, medida pelo método de disco difusão e avaliada a partir

dos dados apresentados na Tabela 7, foi observado perda de resistência em alguns isolados, particularmente à classe dos betalactâmicos, enquanto poucas alterações no fenótipo foram detectadas em relação a Nal e CIP, destacando-se inclusive a manutenção da resistência ao ácido nalidíxico na totalidade dos isolados Nal^R. Portanto, não parece que o tratamento pela irradiação, produza cepas mutantes de *Salmonella* resistentes aos antibióticos; este aspecto é evidenciado particularmente em relação aos betalactâmicos, classe onde houve maior conversão R→S, a qual pode ser atribuída à perda de genes extracromossômicos.

O modo de ação do ácido nalidíxico é a interrupção da replicação do DNA. Como a radiação ionizante pode causar danos ao DNA e interferir com o reparo do DNA, Niemira (2005) hipotetizou que as bactérias Nal^R podem ter a síntese de ácidos nucleicos alterada e/ou os sistemas de reparo, o que as torna mais suscetíveis à radiação ionizante.

Para efeito do presente estudo e, tendo em vista a uniformidade de resistência ao ácido nalidíxico (90% das cepas analisadas), não há conclusões que possam ser tiradas em relação às cepas Nal^R e sensibilidade à radiação.

Farrag (2001) reportou que baixas doses de irradiação gama tiveram efeito sobre a atividade antimicrobiana e conteúdo de DNA. Cepas testadas contra diferentes antimicrobianos tornaram-se mais resistentes após a exposição a baixas doses de irradiação gama, ocorrendo com maior frequência em relação a tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, cefalexina, gentamicina, carbenicilin, ácido nalidíxico e outros antibióticos usados contra bacilos Gram negativos e cocos Gram positivos. Estes resultados corroboram aqueles obtidos no presente estudo, relacionados à relativa resistência do ácido nalidíxico e ciprofloxacina; por outro lado salienta-se a suscetibilidade dos betalactâmicos, representada na presente avaliação pela ceftriaxona, cefalosporina de 3^a geração.

Além da importância de *Salmonella* ser. Enteritidis em doença de origem alimentar, um problema adicional tem sido o surgimento e disseminação de cepas apresentando resistência a drogas antimicrobianas, particularmente ceftriaxona e ciprofloxacina (SOUZA et al. 2010; YAN et al. 2003). Infecções com cepas resistentes a estes fármacos podem resultar em dificuldades no tratamento, por serem na atualidade antimicrobianos de primeira linha, utilizados no tratamento da salmonelose invasiva em crianças e adultos, respectivamente.

Os beta-lactâmicos representam a classe mais variada e mais amplamente utilizada de antimicrobianos. Este grupo inclui penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos sendo responsável por aproximadamente 50% dos antimicrobianos utilizados de forma sistêmica, devido principalmente à sua baixa toxicidade e a grande variedade de compostos disponíveis (BUSH, 2001).

A resistência aos betalactâmicos é primariamente causada pela produção de β -lactamases adquiridas. Mais de 340 β -lactamases foram descritas e muitas são identificadas em *Salmonella* sendo motivo de preocupação face ao emprego de cefalosporinas no tratamento da salmonelose em crianças (BUSH, 2001). As β -lactamases, codificadas por genes *bla*, podem ser localizados em diferentes plasmídeos ou no cromossomo. Plasmídeos por sua vez, podem carrear integrons e / ou transposons, os quais podem também estar presente no cromossomo (Guerra et al. 2000; Nastasi et al. 2000; Brown, et al. 2000).

Da mesma forma, a emergência de cepas resistentes as fluoroquinolonas entre as salmonelas paratíficas é de particular interesse, posto que esta classe de agentes antimicrobianos representa a droga de escolha para o tratamento de infecções por *Salmonella* multirresistentes em adultos (ÂNGULO et al., 2000).

A resistência às fluoroquinolonas ainda é incomum em *Salmonella* spp., quando comparada a outros gêneros da família Enterobacteriaceae. No entanto, o uso criterioso de fluoroquinolonas na medicina humana e veterinária é essencial para reduzir a pressão seletiva e evitar a emergência e disseminação de clones resistentes, mantendo o espectro de ação e a eficácia clínica desta classe terapêutica (SOUZA et al., 2010).

O alvo primário da ação de quinolonas em Gram-negativos é a DNA-girase, enquanto a topoisomerase IV é o alvo secundário (PIDDOCK, 2002; HOOPER, 2001; 1999), levando a redução do acúmulo intracelular do agente antimicrobiano, devido a alterações de proteínas da membrana. A DNA girase, é composta por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, e tem como função catalizar o super enrolamento negativo do DNA, ou seja, são essenciais para a manutenção da topologia do DNA (HOROWITZ; WANG, 1987).

Simples mutações no gene *gyrA* geralmente têm sido associadas com um alto nível de resistência ao ácido nalidíxico e diminuição da sensibilidade às fluoroquinolonas e, mutações duplas, com um maior nível de resistência à fluoroquinolonas (SOUZA et al., 2010).

As fluoroquinolonas de segunda geração, como ciprofloxacina e ofloxacina, apresentam maior atividade sobre a enzima DNA-girase do que sobre a topoisomerase IV de bactérias Gram-negativas. Dessa maneira, bactérias Gram-negativas, como *Salmonella*, podem tornar-se resistentes à ciprofloxacina devido a mutações nos genes que codificam a enzima para qual ela apresenta maior atividade, já que a ação antimicrobiana desta droga sobre o alvo secundário não é suficiente para inibir adequadamente a bactéria (SOTO et al. 2003; SOUZA et al. 2010).

Além das mutações nos genes que codificam a enzima DNA-girase, podem ocorrer redução do acúmulo do antimicrobiano no interior da célula bacteriana devido à hiperexpressão das bombas de efluxo e ou alterações nas porinas presentes na membrana externa, que reduzem a permeabilidade ao agente antimicrobiano (SAN-MARTÍN et al., 2005; SOTO et al., 2003).

Em *Salmonella* spp. a resistência às quinolonas se deve principalmente à alterações no sítio de ligação do antimicrobiano com a DNA-girase, devido à mutações em uma região específica do gene *gyrA*, entre os aminoácidos 67 e 106, denominada Região Determinante de Resistência à Quinolona (QRDR) (GIRAUD et al., 2006; SAN-MARTÍN et al., 2005). Até o presente, são conhecidas cinco famílias de genes *qnr* em plasmídeos disseminada entre os patógenos bacterianos (HERNANDEZ et al, 2011). Sua presença nos cromossomos de bactérias ambientais tem sido relatada, incluindo espécies da família Vibrionaceae, as quais podem ser o reservatório de outros genes, mediados por plasmídeos (CATTOIR et al, 2007 e 2008).

No presente trabalho, a detecção de genes de resistência através da PCR, nas cepas e respectivas subculturas sobreviventes a irradiação, evidenciou que nem sempre houve correlação entre a presença do gene e o fenótipo de resistência correspondente, como pode ser observado para as cepas 92 para *bla*CTX, e 92, 8155 e 1289, para *gyrA* e *gyrB*, sugerindo que os genes de resistência quando presentes não foram expressos fenotipicamente. Admite-se, porem, que sua ausência decorra provavelmente da perda do gene, o qual atua como promotor para sua codificação. Por outro lado, as demais cepas analisadas (22 isolados) não apresentaram correlação entre fenótipos e detecção de genes de resistência.

Um importante atributo de virulência bacteriana, refere-se a produção de biofilme, o qual é definido como uma comunidade "de bactérias vivendo em estruturas organizadas em uma interface líquida" (DAVIES, 2003).

Investigações microscópicas da estrutura do biofilme têm revelado que bactérias existem em microcolônias que são encapsuladas em uma matriz de material polimérico extracelular (STARKEY et al. 2004). Devido à proteção conferida às células dentro dessa matriz, os desinfetantes químicos geralmente são incapazes de eliminar a maior parte das bactérias associadas ao biofilme (LUPPENS et al., 2002; JOSEPH et al., 2001; SOMERS et al., 1994). Também tem sido demonstrado aumento da resistência ao tratamento térmico (FRANK; KOFFI, 1990).

Salmonella enterica formadoras de biofilmes são relativamente resistentes a

tratamentos químicos de higienização. Entretanto, são discretos os relatos sobre o efeito da radiação ionizante em *Salmonella* spp. associada a biofilme.

Niemira e Solomon (2005) demonstraram que a radiação ionizante reduz efetivamente populações de salmonelas planctônicas e aquelas associadas a biofilme. A sensibilidade de *Salmonella* à radiação é específica de cepa. Da mesma forma, a influência na sensibilidade a irradiação do microorganismo cultivado, ou seja, planctônicos *versus* associado a biofilme, é também isolado-específica. Em geral, estes resultados mostram que, em contraste a tratamento com antimicrobianos químicos, a eficácia da radiação ionizante é preservada ou melhorada quando se tratam de bactérias associadas a biofilme.

Este aspecto acima mencionado não foi evidenciado no presente trabalho, onde pode ser verificado que células produtoras de biofilme apresentaram resistência, do mesmo modo que a irradiação induziu a formação de biofilme.

Considerando a totalidade de resultados quanto a análise das características fenotípicas, de um modo geral, as alterações relatadas nas culturas recuperadas pós-irradiação, provavelmente são o resultado de mutações acessórias (DAVIES; SINSKEY, 1973). Entretanto a WHO (1981) relata a indução de novos patógenos atribuíveis a irradiação de alimentos.

O dano no DNA é o maior componente da alteração causado pela irradiação ionizante, a qual pode causar mutações e desaparecimento de algumas ou todas as atividades da célula. Após a irradiação as bactérias morrem ou perdem sua habilidade para dividir, algumas contêm conjuntos anormais de cromossomas ou transmitem seus cromossomas anormalmente, enquanto outras exibem mudanças hereditárias. (FARRAG, 2001).

O processo infeccioso de *Salmonella* é um mecanismo complexo onde as bactérias precisam ser capazes de se adaptar a diferentes nichos e a várias condições dentro do hospedeiro. A maioria dos fatores de virulência de *Salmonella* estão agrupados em ilhas de patogenicidade (SPIs). SPI são definidas como grandes cassetes de genes dentro do cromossoma de *Salmonella* que codificam determinantes responsáveis pela virulência bacteriana dentro do hospede. Interessantemente, ambos SPI 1 e SPI 2 codificam Sistema de secreção Tipo III (TTSS), o qual media o fenótipo de virulência translocando proteínas efetoras no citosol da célula do hospede (MARCUS et al. 2000).

Embora haja um grande número de estudos sobre irradiação de alimentos, ainda são discretas as informações sobre a segurança microbiológica de patógenos Gram-negativos sobreviventes a irradiação.

Neste estudo, foi monitorada a expressão de alguns genes de virulência localizados em plasmídeos e cromossoma bacteriano, incluindo as Ilhas de Patogenicidade SPI1, SPI3, SPI4, SPI5, em três cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis e suas respectivas subculturas sobreviventes a irradiação (cepa 92, crescimento ≥ 10 kGy; cepa 3597, 5 kGy e cepa 3305 - 3 kGy, colônias lactose positivas).

Os efeitos da irradiação revelaram que alguns genes de importância para a invasão e sobrevivência nas células hospedeiras, respectivamente *invE/A* e *mgtC*, permaneceram viáveis mesmo após a irradiação, em várias amostras e em diferentes doses de radiação. Isso pode permitir que a bactéria, mesmo após a irradiação, invada as células do hospedeiro e sobreviva em macrófagos, mantendo uma infecção, tal como a cepa original. Entretanto sabe-se que a patogenicidade é multifatorial e quando da ausência de um ou mais genes de virulência, outros podem vir a exercer funções semelhantes através de mecanismos alternativos, o que produz a infecção de forma similar ao mecanismo original. Nesse caso, a perda de alguns genes de virulência pode não afetar a evolução da doença em face da capacidade de adaptação e compensação do arsenal microbiano..

Se considerarmos os resultados obtidos podemos verificar ampla variabilidade destas características. Por exemplo, na cepa 3597, após a irradiação, não foram detectados os genes

invA, essencial para invasão de células do hospedeiro e o gene *mgtC*, necessário para o crescimento em baixa concentração de Mg^{2+} e sobrevivência no interior de macrófagos. Este gene é codificado em uma região conservada da SPI3 e também está presente no cromossomo de vários sorovares de *Salmonella* (RETAMAL et al. 2009).

Assinalou-se ainda variabilidade quanto a detecção de genes cromossômicos e plasmidiais, particularmente o gene *stn*, o qual está relacionado a produção da enterotoxina, bem como o gene *siiE* da SPI 4. Embora os genes da SPI 4 sejam necessários para codificação de adesina não fimbrial em nível intestinal, parece não ter relevância na colonização de aves (MORGAN et al. 2004).

De modo semelhante, resultados discrepantes foram observados nas outras duas cepas avaliadas (92 e 3305).

É interessante observar que a irradiação parece não influenciar na presença dos genes, aliás em algumas ocasiões onde não foram detectados na amostra original, doses de irradiação mais elevadas parecem favorecer a expressão de genes cromossômicos como *stn*, o qual está associado com a expressão de uma enterotoxina ou ainda de relevância como regulador do Sistema de Secreção do Tipo III – T3SS, ou na ativação de genes da SPI 2.

Estudos realizados por Karasova et al (2010) e Desin et al. (2011) reforçam os resultados por nos obtidos quanto a manutenção da expressão gênica por irradiação, particularmente daqueles genes presentes na SPI 1, o qual é essencial para a colonização do fígado e baço de aves.

A utilização de diferentes métodos de subtipagem representa em seu conjunto importantes ferramentas para a vigilância e investigação de surtos e infecções isoladas. Novos métodos de tipagem vêm sendo implementados, visando melhorar o poder discriminatório e a capacidade de reconhecimento quanto a interrelação de isolados independentes, possibilitando que aqueles relacionados possam ser identificados.

Na atualidade, pode-se ainda reconhecer que os métodos de tipagem nem sempre são suficientemente discriminatórios para permitir a diferenciação, com base em alterações pontuais que possam ocorrer.

Na presente investigação, considerando a utilização do PFGE na análise das cepas originais e irradiadas reisoladas, esta afirmativa se concatena com os resultados obtidos, cujas variações são muito tênues, podendo ser considerado de forma incorreta tendo em vista a variabilidade genômica entre os diferentes isolados.

Acredita-se que o esclarecimento quanto as alterações, detectadas a nível de DNA, não apresenta magnitude capaz de ser detectada pela PFGE. Esta assertiva se aplica particularmente aos sorovares, *Salmonella* ser Typhimurium cuja multiplicidade de clones dificulta seu grupamento e *Salmonella* ser Enteritidis, em face a sua clonalidade. Contudo na atualidade admite-se que tais características resultem da disseminação mundial de certos clones específicos.

Historicamente sabe-se que *Salmonella* ser Typhimurium e *Salmonella* ser Enteritidis eram utilizados como rodenticidas desde o século XIX. O uso de *Salmonella* ser Typhimurium em raticidas foi interrompido no início do século XX, mas *Salmonella* ser Enteritidis continuou a ser usada no Reino Unido e na Dinamarca até o início dos anos 1960.

Em 1954 e novamente em 1967, a Organização Mundial da Saúde (WHO, 1967) recomendou que *Salmonella* não fosse utilizada como rodenticida por representar um risco para a saúde humana.

Apesar destas recomendações, rodenticidas contendo *Salmonella* continuam sendo produzidos e utilizados na América Central, do Sul e Ásia. O “Biorat” (Labiofam, Cuba), um rodenticida natural biológico contendo uma cepa de *Salmonella* ser. Enteritidis variedade Danysz, lisina negativa, fagotipo 6a, associada a hidroxicumarina, vem sendo comercializado

em alguns países (PAINTER et al 2004; FRIEDMAN et al.,1996).

Dificuldades na avaliação clonal destes sorovares impulsionaram a rede de subtipagem PulseNet-EUA a estabelecer um protocolo padronizado para Multiple-Locus Variable-Number Tandem Repeat Analysis (MLVA). Um novo *script* de software foi desenvolvido para duas plataformas (Beckman Coulter™ CEQ 8000 e Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130xl). Padronizado para *Escherichia coli* O157, sua utilização para os dois sorovares (*S.Typhimurium* e *S.Enteritidis*) ainda necessita de inúmeros ajustes.

Paralelamente, outros grupos de pesquisa vêm desenvolvendo suas atividades considerando a utilização de metodologia de sequenciamento, ou ainda em paralelo ao emprego de novos métodos de tipagem que permitam avaliar mudanças na população de *Salmonella* ser Enteritidis como a técnica de “Microarray”, permitindo inclusive padronização e fortalecimento para seleção e revelação de características genômicas (GRØNLUND et al., 2011).

A obtenção de seqüências completas permite a construção de um perfil capaz de apontar deleções “*in frame*” que possam melhorar a discriminação entre os diferentes clones oriundos de cepas irradiadas em níveis de irradiação distintos que possam conferir polaridade de cada mutante. Esta assertiva pode ser pautada na avaliação efetivada por outros Laboratórios para diferentes microrganismos.

Avaliar em conjunto seqüências do genoma e aliar com o contínuo desenvolvimento de novas ferramentas de subtipagem poderão conduzir uma revolução na compreensão quanto ao papel desempenhado pela irradiação sobre a célula bacteriana e suas consequências para o homem, aspectos críticos para a segurança alimentar.

Outrossim, infecções bacterianas humanas de origem alimentar ocasionadas por *Salmonella* spp. são consideradas uma questão de segurança crucial em alimentos e o papel desempenhado pela irradiação na viabilidade destes microrganismos necessita ser avaliado a fim de evitar a dispersão de células cujas características possam ser de maior relevância em saúde pública.

6. CONCLUSÕES

Da análise dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- A suscetibilidade de *Salmonella* ser. Enteritidis às diferentes doses de radiação gama foi variável entre as cepas;
- A dose de 5 kGy apresentou maior eficácia na redução/eliminação de *Salmonella* ser. Enteritidis entre 95% das cepas analisadas;
- A dose de 5 kGy não garante eficácia do método para obtenção de produtos livres e/ou seguros em relação a *Salmonella*, indicada por uma cepa resistente a 10 kGy;
- A variabilidade na detecção de algumas cepas após período de 48 ou 96 horas sugere a condição de “viável não cultivável”;
- Ausência de crescimento de *Salmonella* em intervalos inferiores a 48 ou 96h aponta para a aplicabilidade de análise bacteriológica para avaliar a inocuidade de produtos irradiados;
- Não houve diferença na suscetibilidade das cepas a irradiação considerando as vias de contaminação dos ovos;
- A irradiação determinou alterações na morfologia colonial de *Salmonella* ser. Enteritidis independente da dose;
- As alterações bioquímicas bem como a conversão fágica não tiveram relação com a dose e tempo pós-irradiação;
- Não houve diferença na suscetibilidade a irradiação gama entre as cepas primariamente produtoras ou não de biofilme;
- A irradiação induziu a mudanças nos perfis de resistência a antimicrobianos, particularmente aos betalactâmicos;
- Não houve relação entre a perda e expressão de genes de resistência a antimicrobianos e as doses de irradiação;
- Independente da dose utilizada, a irradiação gama induziu a mudanças nos perfis de genes localizados em Ilhas de Patogenicidade - SPI, possivelmente reduzindo o potencial patogênico das cepas irradiadas;
- A análise das cepas reisoladas através do PFGE aponta variações muito tenues, indicando que alterações detectadas em nível de DNA não apresentam magnitude capaz de ser detectada pela PFGE.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com as conclusões acima e com apoio na literatura consultada:

A Irradiação de Alimentos aplicada com intuito de reduzir a carga bacteriana do ovo se mostrou como método capaz de contribuir com a segurança alimentar e possibilidade de reduzir a veiculação de doenças através de seu consumo, contudo se combinada com outros métodos de controle.

Entretanto considerando os resultados obtidos destaca-se a importância de avaliar a eficácia do controle microbiológico em produtos submetidos a irradiação. Mais estudos são necessários, de modo a avaliar o estado de *Viável Mas Não Cultivável* (VNC) bem como os danos ao DNA, muitas vezes não detectáveis pelos métodos ora existentes, de modo a esclarecer o papel da irradiação em linhagens de *Salmonella*.

Tais questões apontam a continua necessidade de conhecer sobre as estratégias de sobrevivência utilizadas por estes patógenos e como eles podem constituir uma importante ameaça à saúde pública.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, G. L.; HENSEL, M. Manipulating cellular transport and immune responses: dynamic interactions between intracellular *Salmonella enterica* and its host cells. **Cell Microbiol.** v. 8, p. 728–737. 2006.
- AL-BACHIR, M.; ZEINOU, R. Effect of gamma irradiation on some characteristics of shell eggs and mayonnaise prepared from irradiated eggs. **J. Food Safety**, v.26, p.348-360. 2006
- ALCOCER, I. R. Sorotipagem, fagotipagem, caracterizacao molecular de cepas de *Salmonella* spp. e avaliacao epidemiologica de surtos ocorridos no Parana de 1999 a 2004. Londrina. 2004. 216f. Tese (Doutorado em Ciencia de Alimentos)-Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.
- AL-TARAZI, Y. H.; ALSHAWABKEH, K. Effect of Dietary Formic and Propionic Acids on *Salmonella Pullorum* Shedding and Mortality in Layer Chicks after Experimental Infection. **J.Vet. Med. B**, v.50, p.112-117. 2003.
- ALTEKRUSE, S.; KOEHLER, J.; HICKMAN-BRENNER, F.; TAUXE, R.V.; FERRIS, K. A. comparison of *Salmonella enteritidis* phage types from egg-associated outbreaks and implicated laying flocks. **Epidemiol Infect** . v.110, p.17-22. 1993.
- ALVES, L. M. C.; COSTA, N. F.; SILVA, M. S.; SALES, S. S.; CORREIA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* Enteritidis: relato de um surto ocorrido em São Luís-MA. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, p. 57-58, 2001.
- ANDRESS, E. L.; DELAPLANE, K.; SCHULER, G. Food Irradiation. 2000. Disponível em: www.fcs.uga.edu/pubs/current/FDNS-E-3.html . Acesso em: 25 set. 2010
- ANDRIGHETO, C. **Disseminação de *Salmonella* Enteritidis isoladas em uma cadeia produtiva industrial avícola: determinação do perfil de resistência a antimicrobianos e caracterização genotípica.** 2006. 99f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.
- ANELLIS, A.; BERKOWITZ, D.; KEMPER, D. Comparative resistance of non-pathogenic bacteria to low temperature and gamma radiation, **Appl. Microbiol.** v. 25, p. 517. 1973
- ANGULO, F. J.; JOHNSON, K. R.; TAUXE, R. V.; COHEN, M. L. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in food animals. **Microb. Drug Resist.**,v. 6, p.77-83. 2000
- ARVANITOYANNIS, I.S. ; STRATAKOS, A.C. ; TSAROUHAS, P. Irradiation applications in vegetables and fruits: A review. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.** v.49, p. 427-462. 2009.
- AVISITE. O Portal da Avicultura na Internet. 2011. Disponível em: <http://www.avisite.com.br/> Acesso em: 20 set. 2011.
- BACK, A.; BELTRÃO, N.; LEÃO, J.A. Monitoria e Controle de Salmonela: aspectos práticos. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, 2006, Chapecó(SC). Anais...Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários. p. 95-103. 2006.
- BAFFONE, W.; CITTERIO, B.; VITTORIA, E.; CASAROLI, A.; CAMPANA, R.;

- FALZANO, L. ; DONELLI, G. Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. **Int. J. Food Microbiol.** v.89, p.31-39. 2003.
- BALL, H.R.; GARDNER, F.A.. Physical and functional properties of gamma irradiated liquid egg white. **Poult. Sci.** v.47, p. 1481-1489. 1968
- BARROW, P.A.; JONES, M.A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C.L; PRESCOTT, J.F.; SONGER,G.; THOEN, C.O. (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infections in animals**, 4.ed. Ames: Blackwell Publishing, p.231-266. 2010.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C.; TUREY, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Amer. J. Clin. Path.** v. 45, p. 493-496. 1966.
- BAUMLER, A. J.; KINGSLEY, R. A.; Host adaptation and the emergence of infectious diseases: the *Salmonella* paradigm. **Molecular Microbiol.** v. 36, p.1006-1014. 2001.
- BEIG, D.; GARCIA, F. C. M. **O embrião de galinha**. Campo Grande, Proed. 1987.
- BHUNIA, A. K. Foodborne microbial pathogens: Mechanisms and pathogenesis. **Food Microbiol.** v.20, p. 339-343. 2008.
- BIER, O. Genero *Salmonella*. p. 634. In: **Microbiologia e Imunologia**. 24^a ed.. Com. Melhoramentos de São Paulo. São Paulo. 1234 p. 1985.
- BOARD, R. G.; TRANTER, H. S. The microbiology of eggs. Egg science and technology. W. J. Stadelman, Cotterill, O.J. (Eds.). The Haworth Press, Inc.: 81, p.104. 1995.
- BOARETTO, T. N. Melhoramento genético em frangos de corte. **Rev. Formação Informação Zootecnia.** v.1, 2009.
- BOHEZ, L.; DUCATELLE, R.; PASMANS,F.; BOTTELDOORN, N.; HAESEBROUCK, F.; VAN IMMERSSEEL, F. *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization of the chicken caecum requires the HilA regulatory protein. **Vet. Microbiol.** v.116, p. 202-210. 2006.
- BOROWSKY, L.M.; BESSA, M.C.; CARDOSO, M.I.; AVANCINI, C.A.M. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isolados de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, p.1474-1479, 2006.
- BOUHRIF, B.; PAGLIETTI, B.; MURGIA, M.; PIANA, A.; COHEN, N.; ENNAJI, M.M.; RUBINO S.; TIMINOUNI, M. Prevalence and antibiotic-resistance of *Salmonella* isolated from food in Morocco. **J. Infect. Dev. Ctries.** v. 28, p.35-40. 2009
- BOYEN, F.; HAESEBROUCK, F.; MAES D.; VAN IMMERSSEEL, F.; DUCATELLE R.; PASMANS, F. Nontyphoidal *Salmonella* infections in pigs: a closer look at epidemiology, pathogenesis and control. *Vet. Microbiol.* n.130, p.1–19. 2008.
- BRASIL. Resolução RDC n.21, de 26 de janeiro de 2001. Regulamento técnico para irradiação de alimentos. **Diário Oficial da União, Brasília.** n.20-E, 29 de janeiro de 2001:35. **Braz. Chicken.** 2011. BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)
- BRASIL. Resolução RDC n.275, de 21 de outubro de 2002, Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Operacionais Padronizados aplicados aos Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 10 ago. 2011.
- BRASIL. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa**

do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 2 jan. 2001. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/index_2001_rdc.htm. Acesso em: 12 mar. 2010.

BRASIL. Resolução RDC nº 35 de 17 de junho de 2009. Dispõe sobre a obrigatoriedade de instruções de conservação e consumo na rotulagem de ovos e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 jun. 2009. Disponível em: http://www.avisite.com.br/legislacao/anexos/nt_rdc35_20090618.pdf. Acesso em: 14 mar 2010.

BRAZILIAN CHICKEN. 2011. Disponível em: <http://www.brazilianchicken.com.br/publicacoes-brazilian-chicken.php>. Acesso em: 12 set. 2011

BROWN, A. W.; RANKIN, S. C.; PLATT, D. J. Detection and characterization of integrons in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. **FEMS Microbiol. Let.** v.191, p.145–149. 2000.

BURLEY, R.W.; VADEHRA, D.V. The viteline membrane. In: **The avian egg: chemistry and biology**. New York: Wiley. 1990.

BUSH, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.** v. 32, p.1085-1089. 2001

CABO VERDE, S.; TENREIRO, R.; BOTELHO, M. L.. Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: HACCP and inactivation studies. **Rad. Phys. Chem.** v.71, p.29-33. 2004.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. **Salmonella na segurança dos alimentos** – Divulgação Técnica do Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, São Paulo, v.70, p.11-13. 2008.

CARVALHO, J.C.A.P., Avaliação de parâmetros da pasteurização de ovos em casca, considerando a destruição da *Salmonella Enteritidis*. 2005. 157p. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de produtos de origem animal- Universidade Federal Fluminense RJ. 2005.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; AUBERT, C.; SOUSSY, C. J.; NORDMANN, P. Unexpected occurrence of plasmid mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. **Emerging Infect. Dis.** v.14, p. 231–237. 2008

CATTOIR, V.; POIREL, L.; MAZEL, D.; SOUSSY, C. J.; NORDMANN, P. *Vibrio splendidus* as the source of plasmid mediated QnrS-like quinolone resistance determinants. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 51, p. 2650–2651. 2007

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. PHLIS Surveillance Data, **Salmonella Annual Summary**. 2006. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmonella.htm>. Acesso em: 02 ago. 2011

CDC. **Salmonella Surveillance: Annual Summary, 2003. Centers for Disease Control and Prevention** – CDC, Atlanta, U.S.A., US Department of Health and Human Services. 2004.

CDC/ Centers for Disease Control and Prevention. **Food Irradiation**. 2005a Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/foodirradiation.htm#howfindmore>. Acesso em: 20 nov. 2010.

CDC/ Centers for Disease Control. Update: *Salmonella enteritidis* infections and shell eggs - United States, 1990. **MMWR**, v.39, p. 902-12. 1990.

CDC/ Centers for Diseases Control and Prevention. Investigation Update: Multistate Outbreak of Human **Salmonella** Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs. 2010.

Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em: 09 ago. 2011

CDC/Centers for Disease Control and Prevention. **Investigation Update: Multistate Outbreak of Human Salmonella Enteritidis Infections Associated with Shell Eggs.** 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/salmonella/>. Acesso em: 12 set. 2011

CDC/Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella Enteritidis*. 2005 b. Disponível em: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salment_g.htm. Acesso em: 20 nov. 2010.

CDC/Centers for Diseases Control. Outbreak of *Salmonella Enteritidis* associated with consumption of raw shell eggs, 1991. **MMWR**. v.41., p.369-372. 1992. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00016832.htm>. Acesso em: 23 jan 2011.

CENA. **Centro de Energia Nuclear na Agricultura**. Desenvolvido pela USP-CENA/PCLQ, 2002-2006. Apresenta textos sobre a divulgação da tecnologia de irradiação de alimentos e outros materiais. 2006. Disponível em <http://www.cena.usp.br/irradiacao/index.asp>>. Acesso em: 20 ago. 2011.

CENÁRIO XXI. **Você consome alimentos irradiados?** 05/08/2006 Disponível em: <http://www.rac.com.br/institucionais/cenario-xxi/2006/08/05/3001/voce-consome-alimentos-irradiados>, Acesso em: 01 ago. 2011

CHART, H.; ROWE, B.; THRELFALL, E.J.; WARD, L.R. Conversion of *Salmonella enteritidis* phage type 4 to phage type 7 involves loss of lipopolysaccharide with concomitant loss of virulence. **Fems Microbiol. Lett.** v.51, p.37-40. 1989.

CHEN, J.; THESMAR, H.S.; KERR, W.L. Outgrowth of *Salmonella* and the physical property of albumen and vitelline membrane as influenced by egg storage conditions. **Int. J. Food Prot.** v. 68, p. 2553-2558. 2005

CLAY, C.E.; BOARD, R.G. Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated hens' Shell eggs. **Epidemiol. Infect.** v .106, p. 271-281. 1991.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: **Informational Supplement**. v. 30, No.1. M100-S21. Wayne, PA. 2010.

CODEX Alimentarius. Hazard Analysis and Critical Control Point System and Guidelines for its Application. *Alinorm 97; 13 A*, Codex Alimentarius Commission, Rome. 1997.

COSTA, G. A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de enterobactérias**. Instituto Oswaldo Cruz, RJ. 120 p. 1972.

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. 2007. Disponível em: http://www.danmap.org/pdfFiles/Danmap_2007.pdf. Acesso em: 20 ag. 2011.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* intestinal mucosa. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.12, p.405-428. 1999.

DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nat. Rev.** v. 2, p.114-122. 2003.

DAVIES, R. ; SINSKEY, A. J. Radiation-Resistant Mutants of *Salmonella* Typhimurium LT2: Development and Characterization. **J. Bacteriol.** v.113, p.133-144. 1973.

DE BUCK, J.; VAN IMMERSEEL, F.; DUCATELLE, R. Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by *Salmonella*. A review. **J. Applied Microbiol.** v. 97, 233-245. 2004.

DE LAPPE, N.; DORAN, G.; O'CONNOR, J. ;O'HARE, C.; CORMICAN, M. Characterization of bacteriophages used in the *Salmonella enterica* serovar Enteritidis phage typing scheme **J. Med. Microbiol.** v. 58, p. 86–93. 2009

DESIN, T.S.; WISNER, A.L.; LAM, P.K.; BERBEROV, E.; MICKAEL, C.S.; POTTER, A.A.; KÖSTER, W. Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis pathogenicity island-1 proteins as vaccine candidates against S. Enteritidis challenge in chickens. **Vet Microbiol.** v.148, p.298-307. 2011

DIEHL, J.F. 1995. **Safety of Irradiated Foods.** New York: Marcel Dekker, Inc. In: FERREIRA, S. R. F. Contribuição da Tecnologia de Irradiação de Alimentos no Fornecimento de segurança Alimentar e Nutricional. Rio de Janeiro, 1999. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana) Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 1999.

DIEHL, J.F. **Safety of irradiated foods.** New York: Marcel Dekker, 1990, 345p.

Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Dis.** v. 45, p. 61–69. 2001

EPPS, N. A.; IDZIAK, E. S. Radiation Treatment of Foods: II. Public Health Significance of Irradiation-Recycled *Salmonella*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.19, p.338-344. 1970.

ERDMAN, I. E., THATCHER, F. S.; MACQUEEN, K. F. Studies on the irradiation of microorganisms in relation to food. II. Irradiation resistant mutants. **Can. J. Microbiol.** v.7, p. 207-215. 1961.

EWING, W. H. The genus *Salmonella*, and antigenic schema for *Salmonella*. In E.P.R.a.W.H. Ewing (ed.), **Edwards & Ewing's identification of Enterobacteriaceae Elsevier Science Publishing Co,** New York, 1986.

FAO/IAEA/WHO. **Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture International Atomic Energy Agency.** Facts About Food Irradiation. 2006 Disponível em <<http://www.iaea.org/icgfi/documents/foodirradiation.pdf>>. Acesso em 27 set. 2010.

FAO/IAEA/WHO. Wholesomeness of food irradiated with doses above 10 kGy: report of a Joint FAO/IAEA/WHO Study Group. WHO Technical Report Series 890. 1999.

FAO/OIE/WHO. **Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance.** In: Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. **Seoul,** Republic of Korea. p.107. 2006

FARKAS, J. Irradiation as a method for decontaminating food. A review. **Int. J. Food Microbiol.** v. 44, p. 189–204. 1998.

FARRAG, H.A. Post irradiation effect on adherent growth slime formation and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* causing human infection. **Sci.** v. 1, p.244-250. 2001.

FDA/ Food and Drug Administration. **Irradiation in the production, processing and handling of food.** 2000. Disponível em: <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/072100a.pdf>. . Acesso em: 10 Jul. 2010.

FERNANDES, S.A.; GHILARDI, A.C.R.; TAVECHIO, A.T.; MACHADO, A.M.O.; PIGNATARI, A.C.C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo,** v.55, p. 59-63. 2003.

FERREIRA, A.P.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. **VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura.** Abril de 2006. Chapecó- SC – Brasil.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. cap. 43, p.329-338.

FIGUEIREDO, F.V. **Susceptibilidade a antimicrobianos e resistência plasmidial de cepas de *Salmonella* isoladas de dois estuários do estado do Ceará- Brasil**. 2008. 68p. Dissertação (Doutorado em Aqüicultura). Centro de Aqüicultura da Universidade Paulista Júlia de Mesquita Filho – UNESP/SP, 2008.

FONSECA, E. L.; MYKYTEZUK, O. ; ASENSI, M. D. ; REIS, E. M. F. ; PAULA, F.L. ; FERRAZ, L. R. ; NG, L. K. ; RODRIGUES, D. P. . Clonality and antimicrobial-resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis isolated from four public hospitals in Rio de Janeiro City. **J.Clin. Microbiol.** v. 44, p. 2767-2772. 2006.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 1996. p. 134-139.

FRANK, J.; KOFFI, R. Surface-adherence growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surface sanitizers and heat. **J. Food Prot.** v.53, p.550-554. 1990.

FRIEDMAN, C.R.; MALCOLM, G.; RIGAU-PÉREZ, J.G.; ARÁMBULO, P.; TAUXE, R.V. Public health risk from *Salmonella*-based rodenticides. **Lancet**.v.347, p.1705-1706. 1996

FROST, J. A.; WARD, L. R.; ROWE, B. Acquisition of a drug resistance plasmid converts *Salmonella* Enteritidis phage type 4 to phage type 24. **Epidemiol. Infect.**v.103, p. 243-248. 1989.

GANTOIS, I.; DUCATELLE, R.; PASMANS,F.; HAESEBROUCK,F.; GAST,R. HUMPHREY, T.J.; VAN IMMERSEEL, F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiol. Rev.** v.33, p.718-738. 2009.

GAST, R. K.; BEARD, C.W. Production of *Salmonella enteritidis*-contaminated eggs by experimentally infected hens. **Avian Dis.** v. 34, p.438-446. 1990.

GAST, R. K; HOLT, P.S. Deposition of phage type 4 and 13a *Salmonella enteritidis* strains in the yolk and albumen of eggs laid by experimentally infected hens. **Avian Dis.** v. 44, p.706-710. 2000.

GAST, R.; GURAYA, R.; GUARD-BOULDIN J. et al. Colonization of specific regions of the reproductive tract and deposition at different locations inside eggs laid by hens infected with *Salmonella* Enteritidis or *Salmonella* Heidelberg. **Avian Dis.**, v.51, p.40-44. 2007.

GAST, R.K.; GUARD-BOULDIN, J.; GURAYA, R.; HOLT, P.S. Effect of prior passage through laying hens on invasion of reproductive organs by *Salmonella enteritidis*. **Int. J. Poult. Sci.**v.8, p. 116-121. 2009.

GAST, R.K.; GUARD-PETTER, J.; HOLT, P.S. Characteristics of *Salmonella* Enteritidis contamination in eggs after oral, aerosol, and intravenous inoculation of laying hens. **Avian Dis.** v.46, p. 629 - 635. 2002.

GAST, R.K.; GURAYA, R.; GUARD-BOULDIN, J.; HOLT, P.S. Multiplication of *Salmonella* Enteritidis on the Yolk Membrane and Penetration to the Yolk Contents at 30 C in an In Vitro Egg Contamination Model. **J. Food Prot.** v.71, p.1905-1909. 2008.

GAST, R.K.; HOLT, P.S. Assessing the frequency and consequences of *Salmonella*

- Enteritidis deposition on the egg yolk membrane. **Poultry Sci.** v. 80, p. 997–1002. 2001
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos.** São Paulo, Livraria Varela, p. 421-442. 2001.
- GILLESPIE, I. A.; O'BRIEN, S. J.; ADAK, G. K.; WARD, L. R.; SMITH, H. R. Foodborne general outbreaks of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 infection, England and Wales, 1992–2002: where are the risks? **Epidemiol. Infect.** v.133, p. 795–801. 2005
- GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. **Microb. Infect.** v. 8, p. 1-8, 2006.
- GLOBO RURAL. Globo Rural deste mês traz reportagem sobre o novo vigor do setor de ovos no Brasil. 2011. Disponível em: <http://www.portaldoagronegocio.com.br/conteudo.php?id=51535>. Acesso em: 18 set. 2011
- GOLDING, S.S.; MATTHEWS, K.R. Intrinsic mechanism decreases susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to multiple antibiotics. **J. Food Prot.** v.67, p. 34-39. 2004.
- GRAY, J. T.; FEDORKA-CRAY, P.J. *Salmonella*. In: CLIVER, D. O.; RIEMANN, H. P. (Eds.). **Foodborne Dis.**, San Diego: Academic Press. p. 55-68. 2002.
- GRIFFITH, R.W.; SCHWARTZ, K. J.; MEYERHOLZ, D.K. Salmonellosis. Diseases of Swine. 9th ed., Ames: Iowa State University Press. cap.45, p.739-754. 2006.
- GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. p. 167. In W.C.C.f.R.A.R.O. *Salmonella* (ed.), v. 9th ed. **Institut Pasteur**, Paris. 2007.
- GRØNLUND, H.; RIBER, L.; VIGRE, H.; LÖFSTRÖM, C.; FOLLING, L.; HUEHN, S.; MALORNY, B.; RÅDSTRÖM, P.; RUDI, K.; HOORFAR, J. Microarray-based genotyping of *Salmonella*: inter-laboratory evaluation of reproducibility and standardization potential. **Int. J. Food Microbiol.** v. 145 Suppl 1, p. S79-85. 2011
- GUARD-PETTER, J. Phage type and other outer-membrane characteristics of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis associated with virulence. **J Bacteriol.** v.182, p. 6472 – 6481. 1999
- GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. **Environ. Microbiol.** v.3, p.421-430. 2001.
- GUERRA, B.; SOTO, S. M.; CAL, S.; MENDOZA, M. C. Antimicrobial resistance and spread of class 1 integrons among *Salmonella* serotypes. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.44, p.2166–2169. 2000.
- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P.A.; WEILL, F.X. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Res. Microbiol.** v.161, p. 26-29. 2010
- GURTLER, J. B.; CONNER, D. E. Survival and Growth of *Salmonella* Enteritidis in Liquid Egg Products Varying by Temperature, Product Composition, and Carbon Dioxide Concentration. **Foodborne Path. Dis.** v. 6, p.561-567. 2009.
- HALL, E. J.; GIACCIA, A. J. **Radiobiology for the Radiologist.** Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, PA, 2006.
- HAMMACK, T.S.; SHERROD, P.S. ; BRUCE, V.R.; JUNE, G.A.; SACHEL, F.B.; ANDREWS, W.H. Growth of *Salmonella* Enteritidis in grade A eggs during prolonged storage. **Poult. Sci.** v. 72:, p. 373-377. 1993.

- HANES, D. Nontyphoid *Salmonella*. In Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H and Vogt, P. H. (Eds.). **International handbook of foodborne pathogens**. New York: Marcel Dekker, Inc. 2003
- HARTUNG, T. E.; STADELMAN, W. J. The influence of metallic cations on the penetration of the egg shell membranes by *Pseudomonas fluorescens*. **Poult. Sci.** v. 41, p.1590–1596. 1962.
- HEIR, E.; LINDSTEDT, B.A.; VARDUND, T.; WASTESON, Y.; KAPPERUD, G. Genomic fingerprinting of shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains: comparison of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and fluorescent amplified-fragment-length polymorphism (FAFLP). **Epidemiol. Infect.** v.125, p. 537-548. 2000.
- HELSON, S. Estimating the incidence of food-borne *Salmonella* and effectiveness of alternative control measures using the Dephi method. **Int. J. Food Microbiol.**, v.33, p.195-204, 1997.
- HENSEL, M. Evolution of pathogenicity island of *Salmonella enterica*. **Intern. J. Med. Microbiol.** v. 294, p. 95-102. 2004
- HERNÁNDEZ, A. ;SÁNCHEZ, M.B.; MARTÍNEZ, J.L. Quinolone resistance: much more than predicted. *Frontiers in Microbiology* v. 2. p.1-6. 2011
- HOBBS, B.C.; ROBERTS, D. Toxinfeções e controle higiênico sanitário de alimentos. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 376 p.
- HOFER, E.; SILVA FILHO, S.J.; REIS, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v. 17, p. 55-62. 1997.
- HOFER, E.; SILVA, F.O.S.J.; REIS, E.M.F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v. 18, p. 21-27. 1998.
- HOOPER, D. C. Emerging mechanism of fluoroquinolone resistance. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 7, p. 337-341. 2001.
- HOOPER, D. C. Mechanism of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates*, Edinburgh, v. 2, p. 38-55. 1999.
- HOROWITZ, D.S.; WANG, J.C. Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli* DNA gyrase. **J. Biol. Chem.** Oxford, v. 262, p. 5339-5244. 1987.
- HUANG, S.; HERALD, T.; MUELLER, D. Effect of electron beam irradiation on physical, physiochemical, and functional properties of liquid egg yolk during frozen storage. **Poultry Sci.** v.76, p.1607-1615. 1997.
- HUDSON C.R, GARCIA M, GAST RK, MAURER JJ. Determination of close genetic relatedness of the major *Salmonella enteritidis* phage types by pulsed-field gel electrophoresis and DNA sequence analysis of several *Salmonella* virulence genes. **Avian Dis.** v.45, p. 875–886, 2001.
- HUMPHREY, T. J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella enteritidis*: a review. **Int. J. Food Microbiol.** v.21, p.31-40. 1994.
- HUMPHREY, T. J.; WHITEHEAD, A.; GAWLER, A. H. L.; HENLEY, A.; ROWE, B. Numbers of *Salmonella enteritidis* in the contents of naturally contaminated hens' eggs. **Epidemiol.Infect.** v.106, p.489 - 496. 1991.

HUMPHREY, T. **Public health aspects of *Salmonella* infection.** pp. 245-262, in: C. Wray and A. Wray (eds). *Salmonella in Domestic Animals*. Wallingford, UK: CABI Publishing. 2000.

HUMPHRIES, T. *Salmonella* Typhimurium definitive type 104 – a multi-resistant *Salmonella*. Intern. **J. Food Microbiol.** v.67, p. 173-186. 2003

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). **Produção Animal no 1º Trimestre de 2011** IBGE 2011. Disponível no site: http://186.228.51.37/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201101comentarios.pdf. Acesso em 12 set. 2011.

IEAE/ **International Atomic Energy Agency** . 1999. Facts about food irradiation. Disponível em: <http://www.iaea.org/Publications/Booklets/foodirradiation.pdf> Acesso em: 12 Set. 2011.

IRINO, K., FERNANDES, S.A., TAVECHIO, A.T., NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G. Progression of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**, São Paulo. v. 38, p.193-196. 1996.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. ed. Artmed, Porto Alegre. 2005. 711 pp.

JOSEPH, B., OTTA, S. K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **Int. J. Food Microbiol.** v.64, p.367–372. 2001.

KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; HAVLICKOVA, H.; SISAK, F.; VOLF, J.; FALDYNA, M.; ONDRACKOVA, P.; KUMMER, V.; RYCHLIK, R. Influence of 5 major *Salmonella* pathogenicity islands on NK cell depletion in mice infected with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **BMC Microbiol.**, v. 10, p.75. 2010

KARLINSKI, J. Zur kenntnis des *Bacillus enteritidis* Gaertner. **Zbl. Bakt. Parasitenkd.** v. 6, p. 289-292. 1889.

KISS T., MORGAN, E.; NAGY, G. Contribution of SPI-4 genes to the virulence of *Salmonella enterica*. **FEMS Microbiol Lett.** v.275, p.153-159. 2007.

KORSAK, N.; CLINQUART, A.; DAUBE, G. *Salmonella* spp. dans les denrées alimentaires d'origine animale: un réel problème de santé publique? **Ann. Méd. Vét.** v.148, p.174-193, 2004.

KOTTWITZ, L.B.M.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ALCOCER, I.; FARAH, S.M.S.S.; ABRAHÃO, W.S.M.; RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scient. Health Sci.**, Maringá, v. 32, p. 9-15. 2010.

LACONCHA, I.; BAGGESEN, D. L.; REMENTERIA, A.; GARAIJAR, J. Genotypic characterization by PFGE of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis phage types 1, 4, 6, and 8 isolated from animal and human sources in three European countries. **Vet. Microbiol.** v. 75, p. 155-165. 2000.

LANDGRAF, M. **Fundamentos e perspectivas da irradiação de alimentos visando ao aumento de sua segurança e qualidade microbiológica.** 91p. 2002. Tese (Livre-Docência) .Universidade de São Paulo. 2002

LICCIARDELLO, J. J., NICKERSON, J. T. R.; GOLDBLITH, S. A.; BISHOP, W. W.; SHANNON, C. A. Effect of Repeated Irradiation on Various Characteristics of *Salmonella*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.18,p.636-640. 1969.

- LI-CHAN, E.C.Y.; POWRIE, W.D.; NAKAI, S. The chemistry of eggs and egg products. p. 105-175. In: STADELMAN, W.J.; COTTERILL, O.J. (ed.). Egg science and technology. The Haworth Press, New York. 1995
- LÍRIO, V.S.; SILVA, E.A.; STEFONI, S.; NEVES, D.V.D.A.; OLIVEIRA, V.M.R. Frequência de 17 sorotipos de *Salmonella* isolados em alimentos. **Hig. Alimentar**. v. 12, p. 36-42. 1998.
- LOAHARANU, P. Irradiation cold pasteurization process of food. **Ann.Rev.Nut.** v.17, p.255-275. 1997.
- LOGUE, C.M.; SHERWOOD, J.S.; OLAH, P.A.; ELIJAH, L.M.; DOCKTER, M.R. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. **J. Appl. Microbiol.** v.94, p.16–24. 2003.
- LUPPENS, S. B. I.; REIJ, M.W.; VAN DER HEIJDEN, R. W. L.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. **Appl. Environ. Microbiol.** v.68, p. 4194–420. 2002.
- MA, C. Y. Effects of gamma irradiation on physicochemical and functional properties of eggs and egg products. **Radiat. Phys. Chem.** v.48, p.375-375, 1996.
- MADRID, A. V.; CENZANO, J.; VICENTE, J. M. Manual de Industria dos Alimentos. São Paulo: Varela, 1996. p-489-495..
- MAHAPATRA, A. K.; MUTHUKUMARAPPAN, K.; JULSON, J. L. Applications of Ozone, Bacteriocins and Irradiation in Food Processing: a Review. **Crit. Rev. Food Sci. Nut.** v.45, p.447-461. 2005.
- MARCUS, S.L.; BRUMELL, J.H.; PFEIFER, G.; FINLAY, B.B. *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages. **Microbes Infect.**, v.2, p.145-156, 2000.
- MESSENS, W.; GRIJSPEERDT, K.; HERMAN, L. Eggshell characteristics and penetration by *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis through the production period of a layer flock. **British Poultry. Sci.** v. 46, p. 694-700. 2005.
- MÉSZÁROS, L.; HORTI, K.; FARKAS, J. Changes of hen eggs and their components caused by non-thermal pasteurizing treatments I. gamma irradiation of shell eggs. **Act. Aliment.** v. 35, p.229-236, 2006.
- METHNER, U.; AL-SHABIBI, S.; MEYER, H. Experimental oral infection of specific pathogen-free laying hens and cocks with *Salmonella* Enteritidis strains. **J. Vet. Med.** v. B 42, p. 459–469. 1995.
- MILAN, J.; ADURTZ, G.; MORENO, B.; JUSTE, R. A.; BARRAL, M. *Salmonella* isolates from wild birds and mammals in the Bosque Coutry (Spain). **Scient.Tech. Rev. OIE.** v. 23, p. 905-911. 2004.
- MILES, R.D. Fatores nutricionais envolvidos com a qualidade da casca dos ovos. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA, 4, Goiânia. **Anais...** Goiânia, p. 163-174. 2000
- MIN, B.R.; NAM, K.C.; LEE, E.J.; KO, G.Y.; TRAMPEL, D.W. ; AHN, D.U. Effect of irradiating shell eggs on quality attributes and functional properties of yolk and white. **Poult. Sci.** v. 84, p. 1791-1796. 2005
- MOHAMED, J. A.; HUANG, D.B. Biofilm formation by enterococci. **J. Med. Microbiol.** v.56, p. 1581–1588. 2007.

- MORGAN, E.; CAMPBELL, J.D.; ROWE, S.C.; BISPHAM, J.; STEVENS, M.P.; BOWEN, A.J.; BARROW, P.A.; MASKELL, D.J.; WALLIS, T.S. Identification of host-specific colonization factors of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Mol Microbiol.** v. 54, p. 994–1010. 2004.
- MURASE, T.; HOLT, P. S.; GAST, R.K. Growth of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in albumen and yolk contents of eggs inoculated with this organism onto the vitelline membrane. **J. Food Prot.** v. 68, p. 718-721. 2005.
- NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D.M.S.; SCHMIT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de DTA no Rio Grande do Sul, em 2000. **Acta Sci. Vet.** v. 32, p.47-51. 2004
- NARVAIZ, P. , LESCANO, G.; KAIRIYAMA, E. Physicochemical and sensory analyses on egg powder irradiated to inactivate *Salmonella* and reduce microbial load. **J. Food Safety.** v.12, p.263-282. 1992.
- NASCIMENTO, M.S; BERCHIERI JUNIOR, A.; BARBOSA, M.D.; ZANCAN, F.T.; ALMEIDA, W.A.F. Comparação de meios de enriquecimento de plaqueamento utilizados na pesquisa de *Salmonella* em carcaças de frango e fezes de aves. **Rev. Bras. Cienc. Avic.,** v.2, p.85-91, 2000.
- NASCIMENTO, V. P.; SALLE, T. P. S. Biologia das Aves. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Eds) **Manejo da Incubação.** 2.ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2003. p. 163-179.
- NASTASI, A.; MAMMINA, C.; CANNOVA, L. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis, Southern Italy, 1990–1998. **Emerging Infect. Dis.** v. 6, p.401–403. 2000.
- NEGRETE, I.D.R.A. Sorotipagem, fagotipagem, caracterização molecular de amostras de *Salmonella* spp. e Avaliação Epidemiologia de surtos ocorridos no Paraná 1999 a 2004. 2005. 216 p. Tese (Doutorado Ciências de Alimentos). Universidade Estadual de Londrina. Parana.
- NEWELL, D. G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.; GIESSEN, J. V. D.; KRUSE, H. Food-borne diseases-the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. International. **J. Food Microbiol.** v. 139, S3-S15. 2010.
- NIEMIRA, B. A.; SOLOMON, E. B. Sensitivity of Planktonic and Biofilm-Associated *Salmonella* spp. to Ionizing Radiation **Appl. Environ. Microbiol.** v. 71, p. 2732–2736. 2005.
- NIEMIRA, B.A. **Nalidixic acid resistance increases sensitivity of *Salmonella* to ionizing radiation in buffer and in orange juice.** International Association for Food Protection Annual Meeting, Baltimore, Abs p.1-33, MD, 2005.
- NOTÍCIAS UNIFRANGO. **Embarque de ovos em queda.** Disponível em: http://www.unifrango.com/ler_noticias.php?noticia=MTk5MA== Acesso em: 23 set. 2011
- NUNES, I. A.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; MEAD, G. C.; SANTOS, M. A. A.; SOLARI, C. A.; SILVA, O. R.; FERREIRA, A. J. P. Phage typing of *Salmonella* Enteritidis from different sources in Brazil. **J. Food Prot.** v. 66, n. 2, p. 324-327, 2003.
- O'BRIEN, T.F., Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clin. Infect. Dis.** v.34, p. S78-S84. 2002

- OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K. ; BABA, E.
- OLIVE, M.D.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**; v. 6, p.1661- 1669. 1999.
- OLIVEIRA, B.L. **Ovo: qualidade é importante**. Lavras, 1999. Disponível em: <http://www.sna.agr.br/artigos/artitec-ovos.htm>> Acesso em 12 de agosto de 2011.
- OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; MICHAEL, G. B.; et al. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from different sources. **Brazilian J. Microbiol.** v.34, supl. 1, p. 123-124. 2003.
- OLIVER, J. D.; DAGHER, M.; LINDEN, K. Induction of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* into the viable but nonculturable state following chlorination of wastewater. **J. Water Health**, v. 3, p.249-257. 2005.
- OMS/Organización Mundial de la Salud.. Control de la salmonelosis: importância de la hygiene veterinária y de los productos de origen animal. Série de Informes Técnicos n^o 774. 1988
- ORDÓÑEZ, J.A. Ovos e produtos derivados. In: **Tecnologia de alimentos. Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, p. 269-279. 2005.
- PADRON, M. *Salmonella typhimurium* penetration through the eggshell of hatching eggs. **Avian Dis.** v. 34, p.463-465. 1990.
- PAINTER, J.A.; MOLBAK, K.; SONNE-HANSEN, J.; BARRETT, T.; WELLS, J.G.; TAUXE, R.V. *Salmonella*-based rodenticides and public health. **Emerg Infect Dis.**v.10, p. 985-987. 2004
- PATRICK, M.E.; ADCOCK, P.M.; GOMEZ, T.M.; et al. *Salmonella* Enteritidis infections, United States, 1985–1999. **Emerg. Infect. Dis.** v. 1, p.:1–7. 2004
- PEREIRA, A.S.C. Irradiação em Alimentos. **Rev. Carne**. Ed. n^o 324. 2004
- PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; SADER, H.S. Molecular biology-PFGE analysis of chromosomal restriction fragments. In: **Clinical Microbiology Procedures Handbook** Washington, ASM Press p.10.5.c-10.5.c.11.1992.
- PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance in *Salmonella* serovars isolated from humans and food animals. **FEMS Microbiol. Rev.** v. 26, p. 3-16.2002.
- PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance: over use of fluoroquinolones in human and veterinary medicine can breed resistance. **British Med. J.** v. 317, p. 1029-1030, 1998.
- PINTO, P.; RIBEIRO, R. SOUSA, L.; VERDE, S.C.; LIMA, M.G.; DINIS, M.; SANTANA, A.; BOTELHO, M. L. Sanitation of chicken eggs by ionizing radiation: functional and nutritional assessment. **Radiat. Phys. Chem.** v.71, p.35-38. 2004.
- POPPE, C. *Salmonella* infections in the domestic fowl, in: *Salmonella in Domestic Animals* (C. WRAY and A. WRAY eds), pp 107-132, UK: CABI Publishing, 2000
- PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A. et al. - Tipificación fágica de aislados de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias e avícolas en Chile. **Rev. Panamer. Salud Públ.** v. 9, p. 7-12. 2001.
- PRODLOVE, K. **Os alimentos em debate: uma visão equilibrada**. São Paulo: Varela. 1996. p. 108-111.

- RAJKOWSKI, K. T.; NIEBUHR, S. E; DICKSON, J. Effect of gamma or beta radiation on *Salmonella* DT 104 in ground pork. **J. Food Prot.** v. 69, p. 1430 – 1433. 2006.
- RANKIN, S.; PLATT, D. J. Phage conversion in *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: implications for epidemiology. **Epidemiol. Infect.** v.114, p.227–236. 1995.
- RETAMAL, P.; CASTILLO-RUIZ, M.; MORA, G.C. Characterization of MgtC, a Virulence Factor of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **PLoS ONE.** v. 4, p. 1-6. 2009
- RIBOT ,E.M.; FAIR, M.A.; GAUTOM, R. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis.** v. 3, p. 59–67. 2006
- RIEDEL, G. Controle Sanitário dos Alimentos. 2ª ed., São Paulo: ed. Atheneu, 1996. 320 p.
- RODRIGUES, D.P. ; FONSECA, E. L. ; MORAES, B. A. ; ASENSI, M. D. ; REIS, E. M. F. . Produção de ESBL em *Salmonella* Infantis isoladas de crianças na faixa etária de 0-3 anos. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2001, Foz de Iguaçu. Livro de Resumos. Foz de Iguaçu : gráfica, 2001. p. 158-158.
- RODRIGUES, D. P.; REIS, E.M.F.; ARAUJO, M.S.; SILVA, G.C.M.; GOMES, E.D.T.; SANTOS, A.F.M.; SILVA, E.O.; SILVA, G.A.; COSTA, R.G.; FESTIVO, M.L.; PEREIRA, C.S; LÁZARO, N.S.; BERTO, L.H. Laboratory based surveillance of *Salmonella* spp. isolated in Brazil from 2000-2009. **I3S-International Symposium Salmonella and Salmonellosis.** p.377-378, 2010.
- RODRIGUES, D.P. Relatório Anual de Atividades do Laboratório de Referência Nacional Cólera & Enteroinfecções Bacterianas, 2005-2011. **CGLAB/DEVEP/SVS. 2011**
- RODRIGUES, D.P.; LÁZARO, N.S.; REIS, E.M.F. Manual de procedimento para o Diagnóstico Laboratorial de *Salmonella*. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – CGLAB/DEVEP,SVS/MS. 86 p. 2006.
- ROSE, S. P. **Reproducción de la hembra.** In: Principio de la Ciencia Avicola. Zaragoza, Espanha: Acribia, 1997. p. 47-78.
- ROWAN, N. J. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: Quo Vadis? **Trends Food Sci. & Tech.** v.15, p.462-467. 2004.
- RYCHLIK, I; KARASOVA, D.; SEBKOVA, A.; VOLF, J.; SISAK, F.; HAVLICKOVA, H.; KUMMER, V.; IMRE, A.; SZMOLKA, A.; NAGY, B. Virulence potential of five major pathogenicity islands (SPI-1 to SPI-5) of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis for chickens. **BMC Microbiology**, v.9, p.1-9. 2009.
- SALYERS, A. A.; WHITT , D. D. **Bacterial Pathogenesis.** A Molecular Approach. Washington: ASM Press, 1994. p.229–243.
- SAN MARTÍN, B.; LAPIERRE, L.; TORO, C.; BRAVO, V.; CORNEJO, J.; ORMAZABAL, J. C.; BORIE C. Isolation and molecular characterization of quinolone resistant *Salmonella* spp. from poultry farms. **Vet. Microbiol.**, v. 110, p. 239-244. 2005.
- SANSONETTI, P. Host–pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. **GUT.** v.50, p.:iii2-iii8. 2002. Disponível em: http://gut.bmj.com/content/50/suppl_3/iii2.full. Acesso em: 20 ago 2011.
- SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; FLORES, M. L.; ROSEK, H.; D'ANDREA, A.;

- ALBUQUERQUE, M. C.; RAMPANELLI, Y.; MACHADO, N. P.; RIOS, S.; FERNANDES, S. A. *Salmonella* Enteritidis isoladas de amostras clínicas de humanos e de alimentos envolvidos em episódios de toxinfecções alimentares, ocorridos entre 1995 e 1996, no Estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Hig. Alimentar**, v.16, p. 93-99. 2002.
- SANTOS, L.R.; NASCIMENTO, V.P.; OLIVEIRA, S.D.; RODRIGUES, D.P.; REIS, E.M.F.; SEKI, L.M.; RIBEIRO, A.R.; FERNANDES, S.A. Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**. v. 45, p. 01-04. 2003
- SARGUNA, P.; LAKSHMI, V. Neonatal septic arthritis due to *Salmonella* Typhimurium. **Indian J. Med. Microbiol.** v.23, p.66-67. 2005.
- SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 17, p. 14-56, 2004.
- SCHOENI, J.L.; GLASS, K.A.; MCDERMOTT, J.L.; WONG, A.C.L. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. **Int. J. Food Microbiol.** v.24, p.385-396. 1995
- SERRANO, L.; MURANO, E.; SHENOY, K.; OLSON, D. D values of *Salmonella enteritidis* isolates and quality attributes of shell eggs and liquid whole eggs treated with irradiation. **Poultry Sci.** v.76, p.202-206.1997.
- SHELOBOLINA, E.S.; SULLIVAN, S.A.; O'NEILL K.R.; NEVIN,K.P.; LOVLEY,D.R. Isolation, characterization, and U(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. **Appl. Environ. Microbiol.** v.70, p.2959-2965. 2005.
- SHIMOKOMAKI, M.; OLIVIO, R.; TERRA, N.N.; FRANCO, B.D.G.M. Atualidades
- SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Ciênc. Avíc.** v. 4, p. 85-100. 2002.
- SILVA, E.N. *Salmonella enteritidis* em aves e saúde pública. **Hig. Alimentar.** v.9, p. 7-12, 1995.
- SILVA, J. A.; SOARES L. F.; COSTA, E. L. Sanitização de carcaças de frango com soluções de ácidos orgânicos comerciais e suco de limão. **Rev. Tec. Carnes.** Campinas, São Paulo, v.3, n.1, p.19-26. 2001.
- SIMÕES, M.; MARQUES, E.G.L.; ROCHA, M.M.M.; PRANDI, M.A.G.; PISANI, B. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* ocorridos na região de Campinas no período de março de 1995 a março de 2001. In: XXI CONG. BRAS. MICROBIOLOGIA. PR. p.413. 2001
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W.G. Statistical Methods. **Iowa State University Press, Ames, IA.** 1989.
- SOMERS, E. B.; SCHOENI, J. L.; WONG, A. C. L. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*. **Int. J. Food Microbiol.** v.22, p. 269–276. 1994.
- SOTO, S. M.; RODRÍGUEZ, I.; RODICIO, M. R.; VILA, J.; MENDOZA, M. C. Detection of virulence determinants in clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and mapping on macrorestriction profiles. **J. Med. Microbiol.** v.55 p.365-373. 2006.

- SOTO, S. M.; RUIZ, J.; MENDOZA, M. C.; VILA, J. In vitro fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: analysis of mechanisms involved in resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents*. v. 22, p. 537- 540, 2003.
- SOUZA, R. B.; MAGNANI, M.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, p. 413-428. 2010.
- SOUZA-SOARES, L.A.; SIEWERDT, F. **Aves e ovos**. Pelotas: Editora da Universidade UFPEL, 2005.
- SPOLAORE, A. J. G.; GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Irradiação de Alimentos**. In: GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo, Livraria Varela, p. 421-442. 2001.
- STADELMAN, W. J.; COTTERILL, O. J. **Egg science and technology**. 2. ed. Westport: Avi Publishing. 323 p. 1977.
- STADELMAN, W.J. The preservation of quality in shell eggs. In: STADELMAN, W.J. *Science and Technology*. 3 ed. Westport: AVI, 1986, p.63-96.
- STANLEY, J.; GOLDSWORTHY, M.; THREFFALL, E.J. Molecular phylogenetic typing of pandemic isolates of *Salmonella enteritidis*. **FEMS Microbiol Lett**;v. 90,p. 153-160. 1992
- STARKEY, M.; GRAY, K. A.; CHANG, S. I.; PARSEK, M. R. A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms,. In: GHANNOUM, M.; O'TOOLE, G. A. (ed.), **Microbial biofilms**. Washington, DC: ASM Press. 2004. p. 174–191.
- STEFANOVA, R.; VASILEV, N.V.; SPASSOV, S.L. Irradiation of Food, Current Legislation Framework, and Detection of Irradiated Foods. 2010. Disponível em: www.springerlink.com/index/mu1m60718h826470.pdf. Acesso em: 10 Jul. 2010.
- STEPANOVIC´ S., VUKOVIC´ D., DAKIC´ I., SAVIC´ B., S´VABIC´-VLAHOVIC´ M.). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **J. Microbiol. Methods**, v.40, p. 175-179. 2000.
- TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A. T.; NEVES, B.C.; DIAS, A.M.G.; IRINO, K. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.38: 119-127. 1996.
- TAUXE, R.V. *Salmonella*: A postmodern pathogen. **J. Food Prot.** v. 54 563-569. 1991.
- TAVECHIO, A. T.; FERNANDES, S. A.; NEVES, B. C.; DIAS, A. M. G.; IRINO, K. Changing Patterns of *Salmonella* Serovars: Increase of *Salmonella* Enteritidis im São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 38, p. 315-322, 1996.
- TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C.; PERESI, J. T.; FUZIHARA, T. O.; YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDES, A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 though 2000. **J. Food Prot.**, v. 65, p.1041-1044. 2002.
- TELLEZ, I. G.; TREJO, R. M.; SANCHEZ, R. E.; CENICEROS, R. M.; LUNA, Q. P.; ZAZUA, P.; HARGIS, B.M. Effect of gamma irradiation on commercial eggs experimentally inoculated with *Salmonella enteritidis*. **Radiat. Phys. Chem.** v.46, p.789-792. 1995.
- TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; GOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p.2233 - 2239.1995.

- TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; ZANATTA, G.F.; KANASHIRO A.M.I. Incidência de *Salmonella spp.* em pintos de corte recém-nascidos. **Arq. Inst. Biol.**, SP v.70, p.279-281. 2003.
- THORNLEY, M. J. Microbiological aspects of the use of radiation for the elimination of Salmonellae from food and feeding stuffs. **IAEA**, Cambridge, no.22, p.81-106. 1963.
- THREFALL, E.J.; CHART, H.; WARD, L.R.; DE SA, J.D.H.; ROWE, B. Interrelationships between strains of *Salmonella enteritidis* belonging to phage types 4, 7, 7a, 8, 13, 23, 24 and 30. **J Appl Bact.**v.75, p.43-48. 1993.
- TRABULSI, L.R.; PASTERNAK, J. *Salmonella* In: TRABULSI, L.R. Atualização em microbiologia clínica – Microbiologia das infecções intestinais. Livraria Atheneu Ltda - Rio de Janeiro - São Paulo. p. 67 – 78. 1981.
- UBABEF/União Brasileira de Avicultura. Relatório Anual Ubabef 2010/2011. 2011. Disponível em: <http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761>. Acesso em: 15 set. 2011.
- URBAIN, W.M. Radiation chemistry of food components and of foods. In: URBAIN, W.M. Food Irradiation. Orlando: Academic, 1986. cap.3., p.37-82.
- VELGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotyp Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Vet. Res.** v.36, p.267-288. 2005.
- VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, v.33, p. 406-414, 2009.
- WANG, H.; SLAVIK, M.F. Bacterial penetration into eggs washed with various chemicals and stored at different temperatures and times. **J. Food Prot.** v.61, p. 276–278. 199
- WARD, L.R.; DE SA, J.D.H.; ROWE, B. A phage-typing scheme for *Salmonella enteritidis*. **Epidemiol. Infec.**, v. 99, p. 291-294, 1987.
- WATERMAN, S. R.; HOLDEN, D. W. Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. **Cell Microbiol.** v. 5, p.501–511. 2003
- WEENING, E. H.; BARKER, J. D.; LAARAKKER, M. C. ; HUMPHRIES, A. D.; TSOLIS, R. M.; BÄUMLER, A. J. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. **Infect. Immun.** v. 73, p. 3358-3366.. 2005.
- WHITE, D.G.; FEDORKA-CRAY, P.; CHILLER, T.C. The National Antimicrobial Monitoring System (NARMS). **NMC Annual Meeting Proceedings** .p 56-60. 2006.
- WHO/ World Health Organization. Risks assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Series n° 2, Geneva- Switzerland 328p. 2002.
- WHO/ World Health Organization. Risks assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Series n° 2, Geneva- Switzerland 328p. 2001.
- WHO/World Health Organization. Drug-resistant *Salmonella*. Fact sheet N°139. Revised April 2005
- WHO/World Health Organization. Joint FAO/WHO. Expert Committee on Zoonoses: third report. Geneva: World Health Organization; 1967. Technical Report Series: 378.

- WHO/World Health Organization. Wholesomeness of irradiated food: report of a joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. p. 1-34. In: **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 659. 1981.
- WONG, D.M.A.; HALD, T.; VAN DER WOLF, P.J.; SWANENBURG, M. Epidemiology and control measures for *Salmonella* in pigs and pork. **Livestock Product. Sci.** v. 76. p.215-222. 2002
- WONG, Y. C.; HERALD, T. J.; HACHMEISTER, K.A. Comparison between irradiated and thermally pasteurized liquid egg white on functional, physical, and microbiological properties. **Poultry Sci.** v.75, p.803–808, 1996.
- WORCMAN-BARNINKA, D.; LANDGRAF, M. Irradiação de carnes. **Boletim da SBCTA**, Campinas, v.1, n.37, p.22–27, 2003.
- YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, V.M.D.; FEDORKO, D.P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clin. Appl. Immunol. Rev.** v. 4, p.189-204. 2003.
- YAN, S.S.; PENDRAK, M.L.; ABELA-RIDDER, B.; PUNDERSON, V.M.D.; FEDORKO, D.P.; FOLEY, S.L. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. **Clin. Appl. Immunol. Rev.** v. 4, p.189-204. 2003
- ZHOU, D.; GALÁN, J. *Salmonella* entry into host cell: the work in concert of type III secreted effector proteins. **Microb. Infect.** v. 3, p. 1293-1298, 2001.

9. ANEXOS

Anexo A. Características dos genes de virulência pesquisados

Anexo B. Protocolos de PCR

Anexo C. Suscetibilidade de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis frente a diferentes doses de irradiação gama (kGy) em ovos SPF submetidos a contaminação vertical

Anexo D. Meios, Reagentes e Soluções

Anexo A. Características dos genes de virulência pesquisados

Genes da SPI 1	
<i>invE/A</i>	seqüência cobrindo regiões dos dois genes do operon <i>inv/spa</i> , associados a proteínas estruturais do SST3 de SPI 1
<i>sipA</i>	gene do operon <i>sip</i> , relacionado a uma proteína secretada pelo SST3 de SPI 1, cuja função é polimerizar actina G
<i>orgA</i>	gene do operon <i>prg</i> , relacionado a proteínas estruturais do SST3 de SPI 1
<i>hilA</i>	gene regulador principal do SST3 da ilha
Gene da SPI 3	
<i>mgtC</i>	gene do operon <i>mgtCB</i> , regulado por PhoP/Q e necessário a sobrevivência em macrófagos e crescimento em baixas concentrações de Mg ⁺⁺ , no ambiente do fagossoma
Gene da SPI 4	
<i>siiE</i>	gene cujo produto é uma proteína adesina com papel na fase intestinal da doença em bovinos; SiiE é secretada por um sistema de secreção tipo 1 (SST1) encontrado na ilha SPI-4 e formado pelos genes <i>ssiC</i> , <i>ssiD</i> e <i>ssiF</i> .

Genes não incluídos em SPIs (cromossômicos e plasmidiais)	
<i>slyA</i>	gene cromossômico, ativa a expressão do sistema regulador SsrA/B, que atua na expressão do SST3 da ilha SPI 2
<i>phoP/Q</i>	gene cromossômico, sistema regulador negativo da ilha SPI 1, também atua positivamente na ativação dos genes da ilha SPI 2; a regulação negativa do SST3 de SPI 1 decorre do sistema regulador PhoP/Q reprimir a expressão de <i>hilA</i> em resposta as baixas concentrações intracelulares de Mg ⁺⁺ nos macrófagos
<i>stn</i>	gene cromossômico, associado com a expressão de uma enterotoxina
<i>spvC</i>	gene do operon <i>spvRABCD</i> , localizado no plasmídeo de virulência de <i>Salmonella</i> ; o plasmídeo participa no aumento da virulência e na maior persistência do microrganismo em sítios extracelulares

Anexo B. Protocolos de PCR

1. PCR multiplex

Genes pesquisados

orgA, *mgtC*, *phoP/Q*, *spvC*, *stn*, *slyA*, *sopB* (Soto et al., 2006)

invE/A (Guerra et al., 2000)

Reação com 50 µL contendo 2 µL de DNA molde, 200 µM de cada dNTP, 1 µM de cada primer, 2 U de DNA Polimerase e tampão de amplificação.

Programa de amplificação:

Hot start cycle: 94°C - 5 min

30 ciclos:

- Desnaturação: 94°C - 1 min
- Temperatura de anelamento: 60°C - 1 min
- Temperatura de extensão: 72°C - 2 min
- Extensão final: 72°C por 5 min

Alíquotas de 15 µL do amplificado foram analisadas em eletroforese em gel de agarose a 2% usando TAE (Tris-acetate/EDTA) como tampão. O gel é corado por brometo de etídio e visualizado na UV.

SET I - *org A* - 540 pb

SET II - *invE/A* (500 pb), *mgtC* (655 pb)

SET III - *phoP/Q* (299 pb), *spvC* (424 pb), *stn* (617 pb), *slyA* (700 pb), *sopB* (1170 pb)

2. PCR multiplex

Genes pesquisados: *hilA* e *sipA* (Bohez et al., 2006)

Condições da Reação de PCR

Desnaturação inicial: 95°C - 2 min

30 ciclos:

- Desnaturação: 95°C - 30 segundos
- Temperatura de anelamento: 55°C - 30 segundos
- Temperatura de extensão: 72°C - 1 min

Extensão final: 72°C - 5 min

hilA gene

Product size: 500 bp

sipA gene

Product size: 766 bp

3. PCR

Gene pesquisado: *siiE* (KISS; MORGAN;NAGY, 2007)

Condições da Reação de PCR

Desnaturação inicial: 95°C - 2 min

30 ciclos:

- Desnaturação: 95°C - 30 segundos
- Temperatura de anelamento: 55°C - 30 segundos
- Temperatura de extensão: 72°C -1 min

Extensão final:

72°C - 5 min

Product size: 608 bp

Obs: Anelamento: 55°C ou 56°C

Anexo C. Suscetibilidade de cepas de *Salmonella* ser. Enteritidis frente a diferentes doses de irradiação gama (kGy) em ovos SPF submetidos a contaminação vertical

Cepa	Dose (kGy)	Dia zero	24h	48h	96h	1 semana
71	1,0	0	0	0	0	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	$2,1 \times 10^2$
	3,0	0	0	0	0	$4,3 \times 10^1$
	5,0	0	0	0	0	0
231	1,0	0	0	$2,6 \times 10^1$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	$0,6 \times 10^1$	$0,9 \times 10^2$
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
11289	1,0	0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	0
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
11318	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	0
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
10483	1,0	0	$7,6 \times 10^2$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	$\geq 10^5$
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
3305	1,0	0	$0,4 \times 10^2$	$8,4 \times 10^2$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	3,0	0	0	$1,2 \times 10^2$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	5,0	0	0	0	0	0
3411	1,0	0	$4,0 \times 10^2$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	0
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
3597	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	$7,2 \times 10^3$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	3,0	0	0	0	$0,26 \times 10^2$	$2,76 \times 10^2$
	5,0	0	0	0	0	$0,23 \times 10^2$
5452	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	0
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
8155	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	$1,4 \times 10^2$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	3,0	0	0	0	0	$0,9 \times 10^2$
	5,0	0	0	0	0	0

1862	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	0
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
7951	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	0
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
8400	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	0
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
93	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	3,0	0	0	0	0	$1,2 \times 10^2$
	5,0	0	0	0	0	0
92	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	$6,2 \times 10^2$
	3,0	0	0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	5,0	0	0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	10	0	0	0	$1,1 \times 10^2$	$0,6 \times 10^2$
94	1,0	0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	$0,46 \times 10^2$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	3,0	0	0	0	$0,23 \times 10^2$	$0,33 \times 10^2$
	5,0	0	0	0	0	0
95	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	0	0	$3,46 \times 10^2$
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
1683	1,0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
813	1,0	0	0	0	$0,6 \times 10^2$	$6,73 \times 10^2$
	1,5	0	0	0	0	0
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0
1686	1,0	0	0	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	1,5	0	0	$7,16 \times 10^2$	$\geq 10^5$	$\geq 10^5$
	3,0	0	0	0	0	0
	5,0	0	0	0	0	0

Anexo D. Meios, Reagentes e Soluções

1. Preparo de Soluções para PFGE

1.1. Preparo de Tampão TE (Solução deve ser preparada de acordo com a quantidade de amostras)

Tris 1M, pH8,0	10mL
EDTA 0,5M, pH 8,0	2mL
Água WFI esteril qsp	1000 mL

1.2. Preparo da agarose SeaKen Gold AL 1% em Buffer TE (10mM Tris: 1mM EDTA, pH 6.0) para plugs de PFGE

Pesar 0.50g de agarose SeaKem Gold (SKG) em um frasco com tampa de rosca com volume de 250mL

Adicionar 50.0mL de buffer TE; agitar suavemente a agarose

Remover a tampa e cobrir com parafilme, colocar no microondas por 30 segundo repetir este procedimento no intervalo de 10 segundos até dissolver completamente a agarose.

1.3. BSC (Tris mM: EDTA 100mM, pH 8.0)

Tris 1M,pH 8.0	10 mL
EDTA 0,5 M pH8.0	20mL
Água WFI estéril qsp	100mL

1.4. Solução tampão de Lise celular celular (Tris 50mM,pH 8.0 + Sarcosyl 1%)

Tris 1M pH 8.0	25mL
EDTA 0.5 M,pH 8.0	50mL
Sarcosyl 10% (N-Lauroylsarcosina sal sódica)	50mL
Água esterilizada Q.S.P.	500mL

Observação: Diluir a solução sarcosil 10%

10g Sarcosil (N-laurilsarcosinol sal sódico)

100mL água WFI (qsp)

Esterilizar 100 – 200mL de água WFI

1.5. Cálculo da quantidade de Proteinase K/Buffer para o lise celular

5mL de Buffer de lise celular (Tris 50mM, pH8.0 + Sarcosyl 1%) por tubo
(exemplo:5mL x 10tubos=50mL)

Adicionar 25µL de uma solução stock de Proteinase K (20mg/mL) por cada tubo
(exemplo:25µL x 10tubos=250µL)

Homogeneizar

- Distribuir 24,0 µl da mistura de reação em cada tubo de PCR;
- Acrescentar 1,0 µl do DNA genômico nos tubos correspondentes a cada amostra;
- Realizar a amplificação em Termociclador, cuja programação com o número de ciclos, tempo e temperatura, é feita de acordo com o gene analisado

Componente	Volume (µl)/reação	Concentração final
Tampão PCR 10X	2,5	1X
Mistura de dNTPs	2,0	200 µM
Iniciador 1	1,0	20 pmol
Iniciador 2	1,0	20 pmol
Taq DNA Polimerase	0,25	1 U
Água Milli-Q®	17,25	-----
Molde de DNA	1,0	20ng
Volume Final	25,0	

2. Solução de Cristal Violeta para Biofilme

Cristal violeta.....0,5g

Água destilada100mL

Deixar em repouso em frasco escuro por 24 horas.

Filtrar em papel de filtro

Manter a solução em frasco escuro

3. Meio de Costa e Vernin (CV)

Este meio é uma modificação do meio de Monteverde (Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 53:105,1955) e é composto de uma camada semi-sólida e outra sólida, permitindo avaliar as seguintes reações: indol (tampão de algodão), fermentação da lactose e sacarose, produção de gás, hidrólise da uréia, produção de H₂S o qual se forma na interface entre semi-sólido e sólido e motilidade. Permite identificação dos principais gêneros de enterobactérias indicando a presença de bactérias não fermentadoras.

O ataque à lactose ou sacarose, ou ambas, com a produção de ácido, torna o meio vermelho. A presença de um anel negro na base da camada sólida indica produção de H₂S; a turvação difusa ou não da parte semi-sólida, revela a motilidade; a coloração azul, distribuída por todo o meio, identifica as bactérias produtoras de urease. Além desses testes, o aparecimento de uma coloração rósea ou vermelha na tira de papel de filtro ou no algodão, caracteriza as bactérias produtoras de indol.

Base Semi-Sólido

Peptona.....	20,0 g
Cloreto de Sódio.....	5g
Solução de Azul de Timol	3 mL
Indicador de Andrade	10 mL
Agar	5g
Água destilada	1000 mL

Adicionar todos os elementos à água e aquecer até dissolver completamente o Agar. Ajustar o pH a 7,3 ou 7,4. Distribuir quantidades exatas do meio em balões e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Base Sólida

Peptona (Bacto)	1g
Triptona ou tripticase	5 g
Tiosulfato de Sódio	0,2 g
Sulfato ferroso Amoniacal.....	0,2 g
Solução de Azul de Timol	3 mL
Indicador de Andrade	10 mL
Agar	20 g
Água destilada	1000 mL

Adicionar os componentes em água destilada e aquecer em banho maria fervente até completa dissolução. Ajustar o pH a 7,3 ou 7,4. Distribuir quantidades exatas do meio em balões e esterilizar a 121°C por 15 minutos.

Preparo e distribuição final do meio

Fundir as bases e resfriar entre 50 a 60°C, aproximadamente. Adicionar a cada um deles, na proporção de 5mL por cada 100 mL de meio, a solução de uréia e açúcares. Distribuir inicialmente o agar semi-sólido em volume de 2,5mL em tubos esterilizados de 13mm de diâmetro com altura variável. Deixar solidificar à temperatura ambiente cerca de 30 minutos, e acrescentar em seguida, volume idêntico por tubo, da base sólida. Incliná-los de modo a deixar uma base de 2 a 3cm de altura, aproximadamente.

Solução de Azul de Timol

Azul de Timol	1,6 g
NaOH 0,1N	34,4 mL
Água destilada	65,6 mL

Indicador de Andrade

Fucsina ácida	0,5 g
Hidróxido de Sódio N	16 mL
Água destilada	100 mL

Dissolver a fucsina em água destilada e adicionar o hidróxido.

Solução de Uréia e Açúcares

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

Dissolver a mistura por aquecimento brando em banho-maria e esterilizar por filtração. Conservar em geladeira.

A semeadura é executada com auxílio de agulha, introduzindo-a até o terço superior da metade da camada semi-sólida e sob a forma de estrias, na superfície da camada sólida. Neste meio, poderá ser pesquisada a produção de indol, fixando no tampão, após a inoculação, uma tira de papel de filtro, embebida no reativo para pesquisa de indol ou então impregnando o próprio algodão (hidrófilo) na sua base interna, com esse reativo. Incubar a 37°C durante 24 a 48 horas.

Reações observadas no meio de Costa e Vernin (CV)

Leitura	Microrganismos
Meio inalterado, com certa alcalinidade no ápice (esverdeado ou azulado). Presença de H ₂ S; ausência de gás; móvel ou imóvel	<i>Salmonella</i> , <i>Edwardsiella</i> <i>Citrobacter</i>
Reações idênticas às acima citadas, sem H ₂ S	Certos sorovares de <i>Salmonella</i> H ₂ S
Meio inalterado no prazo de 24h, podendo se acidificar em períodos mais longos (fermentação lenta); ausência de H ₂ S; móvel ou imóvel	<i>Shigella</i> <i>Providencia</i>
Meio inteiramente azul, com produção ou não de H ₂ S; dificuldade na leitura da mobilidade.	<i>Proteus</i>
Camada sólida azul e amarelo-azulado na porção semi-sólida (ataque à sacarose). Presença de H ₂ S.	<i>Proteus vulgaris</i>
Meio totalmente vermelho, por vezes podendo apresentar áreas amareladas (redução); grande produção de gás. Ausência de H ₂ S. Mobilidade presente ou não. Ápice do meio sólido com discreta alcalinidade na Tribo Klebsielleae.	<i>Escherichia</i> <i>Enterobacter</i> <i>Klebsiella</i> <i>Serratia</i> (meio sem gás)
Meio com discreta acidez na profundidade, ligeira alcalinização na superfície. Presença de H ₂ S, Móvel	<i>Citrobacter</i>
Meio inalterado com 24 h; pequena alcalinização na superfície, acentuando-se após 48 h. Forte tonalidade azul-esverdeada na superfície. Ausência ou discreto crescimento no meio semi-sólido.	<i>Pseudomonas</i>