

Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipagem e caracterização molecular de cepas de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola

Antimicrobial resistance profile, phage typing and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains from poultry origin

Luciana Bill Mikito Kottwitz¹; Mara Cristina Scheffer²; Libera Maria Dalla Costa³; Joice Aparecida Leão⁴; Alberto Back⁴; Dalia dos Prazeres Rodrigues⁵; Marciane Magnani^{6*}; Tereza Cristina Rocha Moreira de Oliveira⁷

Resumo

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) é responsável por prejuízos significativos à avicultura, com conseqüências importantes para saúde pública. No presente estudo foi realizada a caracterização de 38 isolados de SE provenientes de material biológico de reprodutoras destinadas à produção de frangos de corte através de fagotipagem, perfil de resistência antimicrobiana e de eletroforese de campo pulsado (PFGE). Os fagotipos (PT) predominantes foram PT7 e PT9 e 26,3% dos isolados apresentaram resistência ao ácido nalidíxico (NAL). A fagotipagem e a análise do perfil de resistência antimicrobiana juntos mostraram elevado poder discriminatório (0,85). Os perfis de PFGE de 13 cepas, com as endonucleases *Xba*I e *Spe*I permitiram discriminar os fagotipos de SE, bem como associar perfis de um mesmo fagotipo. Os resultados mostram a importância da associação de métodos para a caracterização de SE e sugerem que produtos da avicultura de corte podem ter sido fonte de salmonelose humana durante o período estudado.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, fagotipagem, resistência antimicrobiana, eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Abstract

Salmonella enterica subsp. *enterica* serovar Enteritidis (SE) is currently responsible for significant losses in the poultry industry with consequences on public health. In the present study, 38 SE isolates from biological material of chicken breeders were characterized using phage typing, antimicrobial resistance profile and pulsed field gel electrophoresis (PFGE). The phage type (PT) 7 and 9 were predominant and 26.3% of the isolates were resistance to nalidixic acid (NAL). The phage typing and analysis of antimicrobial resistance profile showed high discriminatory power (0.85). The PFGE profile of 13 strains with *Xba*I and *Spe*I discriminated the SE phage types, as well characterized strains from the same serovar. The results showed the importance to associate different methods for the characterization of SE and suggest that poultry products may have been source of human salmonellosis in the Parana State during the period of study.

Key words: *Salmonella* Enteritidis, phage typing, antimicrobial resistance, pulsed field gel electrophoresis (PFGE)

¹ Prof^ª. da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Cascavel, PR. E-mail: lukottwitz@yahoo.com.br

² Pesquisador, Universidade Federal do Paraná. E-mail: marascheffer@yahoo.com.br

³ Prof^ª.. da Universidade Federal do Paraná. E-mail: lmdallacosta@uol.com.br

⁴ Pesquisadores, Mercolab Laboratórios Ltda, Cascavel, PR. E-mail: joice@mercolab.com.br; alberto@mercolab.com.br

⁵ Pesquisador, Instituto Oswaldo Cruz, RJ. E-mail: daliarodrigues@yahoo.com.br

⁶ Prof^ª.. da Universidade Federal da Paraíba, PB. E-mail: magnani2@gmail.com

⁷ Prof^ª. Dr^ª do Dept^º Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR. E-mail: terezaoliveira@yahoo.com

* Autor para correspondência

Introdução

A indústria avícola brasileira destaca-se como uma das mais produtivas. O Brasil é o maior exportador mundial e o terceiro maior produtor de carne de frango, além de sétimo produtor mundial de ovos. O estado do Paraná é maior produtor de frangos do país (IBGE, 2009), o que implica em atender as exigências dos consumidores internos e externos, tanto no que se refere à sanidade avícola, quanto à qualidade dos alimentos.

Produtos avícolas são os principais veículos de transmissão de *Salmonella* spp. (RIBEIRO et al., 2007), o que se deve, em parte, ao crescimento da indústria avícola dentro de uma visão econômica tipicamente de produção. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Enteritidis (SE) é responsável por significativos prejuízos à avicultura e com caráter de zoonose tem importantes conseqüências para a saúde pública. Em aves, SE pode ser transmitida verticalmente (transmissão transovariana), o que sugere uma adaptação a estes hospedeiros (OKAMURA et al., 2001).

A prevenção e o controle de SE depende da sua adequada detecção e caracterização. A vigilância epidemiológica exige métodos que permitam a subtipagem e investigação da origem e diversidade genética dos isolados de SE, devido ao elevado grau de homogeneidade genética deste sorovar (ZHENG et al., 2007).

A primeira diferenciação de SE emprega os métodos fenotípicos clássicos de fagotipagem e de análise do perfil de resistência a antimicrobianos. Métodos moleculares de análise do DNA complementam estas técnicas em estudos epidemiológicos (WOO, 2005). Devido à estabilidade dos perfis, reprodutibilidade e excelente poder discriminatório, a eletroforese em campo pulsado (*pulsed field gel electrophoresis* – PFGE) tem sido amplamente utilizada em estudos envolvendo *Salmonella* spp., inclusive para diferenciação intersorovares (WOO, 2005; AMMARI et al., 2009).

No presente estudo foram realizadas a caracterização fenotípica e molecular de isolados de SE de origem avícola e sua correlação epidemiológica com surtos de salmonelose humana ocorridos no período estudado foi avaliada.

Material e Métodos

Salmonella Enteritidis (SE)

Trinta e oito amostras de SE isoladas de suabes de cloaca, órgãos e fezes de reprodutoras destinadas à produção de frangos de corte foram obtidas em um Laboratório de Sanidade Avícola, credenciado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, Brasil), durante o período de 2002 a 2006. A sorotipagem e a fagotipagem de *S. Enteritidis* foram realizadas no Laboratório de Enterobactérias, Departamento de Bacteriologia, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos

A suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliada através da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966) conforme recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2006). Os seguintes agentes antimicrobianos (OXOID®) foram testados: ampicilina (10µg); cloranfenicol (30µg); ácido nalidíxico (30µg); cefotaxima (30µg); ciprofloxacina (5µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (25µg).

Gel de eletroforese em campo pulsado (PFGE)

Treze cepas de SE dos fagotipos (PT) 1 (n=2), 7 (n=2) e 9 (n=6) e três não tipáveis (UT) foram caracterizadas. A PFGE foi conduzida segundo protocolo do “The National Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance” (PulseNet) (CDC, 1999). Blocos de gel de agarose de baixo ponto de fusão 2%, contendo o DNA cromossômico, foram submetidos separadamente

à restrição com 30 U de *Xba*I e *Spe*I (1µg/mL, Invitrogen®, Brasil) e incubados em banho-maria a 37°C por 1h e 30min. Após a restrição o material foi submetido à eletroforese de campo pulsado, em equipamento CHEF-DR II (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) com tempo inicial de pulso de 5s e tempo final de pulso de 45s, em voltagem 200V (6V/s) durante 24h a 12°C, em ângulo 120°C. Os géis corados com brometo de etídio 1µg/mL (Pharmacia Biotech) por 30 min e descorados em água destilada por 1h foram visualizados sob luz UV e documentados. Lambda Ladder PFG (New England Biolabs, USA) foi usado como marcador de peso molecular.

Análise Estatística

Os resultados foram analisados com auxílio do software Gel-Pro Analyzer 4.0. A análise da similaridade entre os perfis obtidos foi realizada no programa NTSYS 2.02 utilizando o coeficiente de Dice (1945) e o método de agrupamento UPGMA para geração dos dendrogramas. O poder discriminatório (D) foi calculado com base no índice de diversidade de Simpson (HUNTER, 1990).

Resultados e Discussão

A distribuição das 38 cepas de SE analisadas em fagotipos estão apresentadas na Tabela 1. O poder

discriminatório (D) da fagotipagem foi de 0,719. Os fagotipos mais freqüentes foram PT7 e PT9. O PT4 não foi encontrado entre as cepas analisadas, apesar de ser um fagotipo associado a surtos de salmonelose durante muitos anos no estado do Paraná, Brasil (ALCOCER, 2004). Conforme Kariuky et al. (1999) a prevalência de fagotipos de SE varia nos diferentes países, ou ainda em regiões de um mesmo país, durante um determinado período de tempo. Acredita-se que SE, pelo seu caráter epidêmico, surgiu da expansão clonal de um isolado único e mais virulento, embora, diferentes linhagens tenham sido associadas a surtos na Europa e EUA (HELMUTH; SCHROETER, 1994).

Na Europa é prevalente SE PT4, enquanto SE PT 8 e PT 13^a são os mais encontrados nos Estados Unidos (GUARD-PETTER, 2001; GILLESPIE et al., 2005). Na região Sul do Brasil, SE PT4 mostrou-se predominante desde sua disseminação no país, a partir de 1993, após a importação de matrizes contaminadas de países europeus (DOS SANTOS et al., 2003). No estado do Paraná PT4 predominou como responsável pelos surtos de salmonelose humana ocorridos entre 1999 e 2003 (ALCOCER, 2004). Entretanto, a partir de 2002 foi registrado um declínio de surtos causados por SE PT4, supostamente em consequência das medidas de controle sanitário adotadas na cadeia produtiva avícola (GILLESPIE et al., 2005), o que pode ter favorecido a introdução de outros fagotipos.

Tabela 1. Distribuição conforme fagotipos identificados e perfil de resistência antimicrobiana de amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de material avícola no Estado do Paraná, no período de 2002 a 2006.

Fagotipo	Perfil de Resistência Antimicrobiana			
	Nº de cepas Nº (%)	Resistentes ao Ácido Nalidíxico Nº (%)	Resistentes ao Cloranfenicol Nº (%)	Sensíveis** Nº (%)
UT*	16 (42,1)	5 (13,2)	1 (2,6)	10 (26,3)
PT 9	9 (23,7)	4 (10,5)	---	5 (13,2)
PT 7	9 (23,7)	1 (2,6)	---	8 (21,0)
PT 1	4 (10,5)	---	---	4 (10,5)
Total	38 (100)	10 (26,3)	1 (2,6)	27 (71,0)

UT: Não tipável; ** Sensíveis a todos os antimicrobianos testados: ampicilina (10µg); cloranfenicol (30µg); ácido nalidíxico (30µg); cefotaxima (30µg); ciprofloxacina (5µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (25µg).

Fonte: Elaboração dos autores.

A identificação de PT1 e PT7, observada no presente estudo, concorda com os resultados de Nunes et al. (2003) e Ribeiro et al. (2007), que encontraram SE PT1 e PT7 em amostras de origem avícola no Brasil. Prat et al. (2001) também relataram estes fagotipos entre 384 cepas de SE isoladas de amostras de pacientes, alimentos e material avícola no Chile. Recentemente, Kang et al. (2009) relataram SE PT1 como predominante, entre 173 cepas de SE isoladas de aves e humanos na Coreia. Conforme Laconcha et al. (1998) os fagotipos PT1 e PT7 podem ser derivados do PT4 por conversão.

Informações sobre ocorrência, origem, fontes de contaminação e disseminação de SE PT9 são escassas, embora no período de 2003 a 2006 SE PT9 tenha sido frequentemente associado a surtos de salmonelose humana em diversas regiões incluindo o estado do Paraná, Brasil. A identificação de PT9 como um dos fagotipos predominantes em isolados de SE de origem avícola analisados sugere uma correlação epidemiológica com SE associadas a estes surtos. Além disso, os fagotipos SE PT1 e SE PT7 também já foram associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos no Estado do Paraná (KOTTWITZ et al., 2010).

A PFGE das cepas SE dos diferentes fagotipos identificados no presente estudo, permitiu discriminar 10 perfis distintos (X1-X10) com *XbaI*, e 5 após restrição com *SpeI* (S1- S5). O poder discriminatório (D) de *XbaI* e *SpeI* foi, respectivamente, 0,962 e 0,539. Estes resultados estão de acordo com o relatado por Weide-Botjes; Kobe; Schwarz (1998), que analisaram com *XbaI* e *SpeI* amostras de SE isoladas na Alemanha e observaram D= 0,709 e D=0,702, respectivamente.

Através da análise do coeficiente de similaridade dos perfis de PFGE obtidos com *XbaI* foi possível discriminar os fagotipos de SE e caracterizar cepas de um mesmo fagotipo (Figura 1A). Em contrapartida, com endonuclease *SpeI* o perfil S4 predominou entre as cepas (Figura 1B). Na análise

dos perfis de *XbaI* e *SpeI* de forma combinada, 11 perfis genéticos foram encontrados, porém, devido ao elevado poder discriminatório de *XbaI* não foi identificado um perfil genético predominante.

Conforme Weide-Botjes; Kobe; Schwarz (1998) a observação de que isolados do mesmo grupo genético possam estar ordenados em diferentes fagotipos e de que, isolados do mesmo fagotipo possam estar agrupados em diferentes grupos genéticos, indicam a fagotipagem como um excelente complemento para a tipagem molecular de SE.

Na avaliação do perfil de resistência antimicrobiana as 38 cepas estudadas foram susceptíveis a maioria dos agentes antimicrobianos testados. O poder discriminatório do perfil de resistência antimicrobiana foi de apenas 0,43, no entanto combinado com a fagotipagem, este índice praticamente duplicou (D = 0,85), confirmando a importância da combinação de métodos para uma efetiva caracterização epidemiológica de SE. Do total, 10 cepas (26,3%) mostraram resistência ao NAL e somente uma cepa UT (2,6%) foi resistente ao cloranfenicol (Tabela 1).

As cepas de SE PT1 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, entretanto cepas de SE PT7, SE PT9 e SE UT foram resistentes ao NAL (Tabela 1). Cepas SE resistentes ao NAL tem sido relatadas em diversos estudos (RIBEIRO et al., 2007; DUARTE et al., 2009, KANG et al., 2009). No entanto, Fernandes et al. (2003) e Oliveira et al. (2005) verificaram mais de 90,0% de sensibilidade a esse antimicrobiano, em amostras de SE. NAL é um agente antimicrobiano utilizado na produção avícola com finalidade terapêutica, entretanto sua utilização não-terapêutica favorece a seleção de cepas resistentes, que podem ser transmitidas via cadeia alimentar (THRELFALL, 2002). Aves poedeiras e de corte representam o principal reservatório de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos (RIBEIRO et al., 2007). A ocorrência de cepas resistentes pode causar falha no tratamento clínico,

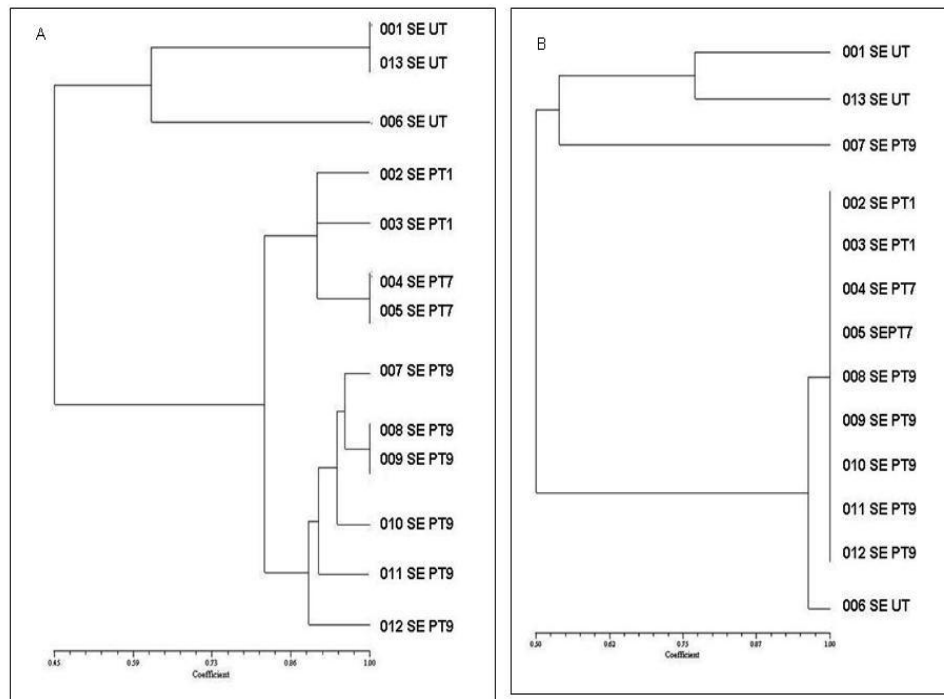
limitando as opções terapêuticas tanto na medicina veterinária como humana, quando há necessidade de tratamento (SOUZA et al., 2010).

Não foi possível correlacionar o padrão de resistência antimicrobiana com os perfis de PFGE, encontrados para as cepas de SE analisadas. A resistência a determinados antimicrobianos pode ser consequência de eventos como a aquisição de plasmídeos, sem que haja alteração do genótipo

(CARDINALE, et al., 2005). Outro fator que pode influenciar na resistência é a pressão seletiva que as cepas sofrem nas granjas de origem.

Os resultados do presente estudo evidenciam a importância da associação de métodos fenotípicos e genotípicos para uma adequada investigação da diversidade de SE e sugerem que cepas de origem avícola podem ter sido fonte de salmonelose humana no estado do Paraná, no período estudado.

Figura 1. Representação do coeficiente de similaridade obtido pela análise de amostras de SE através de PFGE. A: Dendrograma obtido após análise com endonuclease *Xba*I. B: Dendrograma obtido após análise com endonuclease *Spe*I.



Fonte: Elaboração dos autores.

Referências

ALCOCER, I. R. *Sorotipagem, fagotipagem, caracterização molecular de cepas de Salmonella spp. e avaliação epidemiológica de surtos ocorridos no Paraná de 1999 a 2004*. Londrina. 2004. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

AMMARI, S.; LAGLAOUI, A.; EM-NANEI, L.; BERTRAND, S.; WILDEMAUWE, C.; BARRIJAL,

S.; ABID, M. Isolation, drug resistance and molecular characterization of *Salmonella* isolates in northern Morocco. *Journal of Infection in Developing Countries*, Itália, v. 3, n. 1, p. 41-49, 2009.

BAUER, A. W.; KIRBY, M. M. W.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, Chicago, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

- CARDINALE, E.; GROS-CLAUDE, J. D. P.; RIVOAL, K.; ROSE, V.; TALL, F.; MEAD, G. C.; SALVAT, G. Epidemiological analysis of *Salmonella enterica* ssp. *enterica* serovars Hadar, Brancaster and Enteritidis from Humans and broiler chickens in Senegal using pulse-field gel electrophoresis and antibiotic susceptibility. *Journal of Applied Microbiology*, Oxford, v. 99, n. 4, p. 968-977, 2005.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. *One-day (24-28 h) standardized laboratory protocol for molecular subtyping of Salmonella serotype Typhimurium by pulsed field gel electrophoresis (PFGE)*. Atlanta: Centers for Disease Control, Section 5.2, 1999. p. 1.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE – CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *Sixteenth Informational Supplement*, Wayne, v. 26, n. 1, p. 1-10, 2006.
- DICE, L. R. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, Washington D.C., v. 26, n. 3, p. 297-302, 1945.
- DOS SANTOS, L. R.; DO NASCIMENTO, V. P.; DE OLIVEIRA, S. D.; RODRIGUES, D. P.; DOS REIS, E. M. F.; SEKI, L. M.; RIBEIRO, A. R.; FERNANDES, A. A. Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and broiler carcasses in Southern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 1-4, 2003.
- DUARTE, D. A. M.; RIBEIRO, A. R.; VASCONCELOS, A. M. M.; SANTOS, S. B.; SILVA, J. V. D.; ANDRADE, P. L. A.; FALCÃO, L. S. P. C. A. Occurrence of *Samonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 569-573, 2009.
- FERNANDES, S. A.; GHILARDI, A. C. R.; TAVECHIO, A. T.; MACHADO, A. M. O.; PIGNATARI, A. C. C. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 45, n. 2, p. 59-63, 2003.
- 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? *Epidemiology and Infection*, Camdbrige, v. 133, n. 5, p. 795-801, 2005.
- GUARD-PETTER, J. The chicken, the egg and *Salmonella* Enteritidis. *Environmental Microbiology*, London, v. 7, n. 3, p. 421-430, 2001.
- HELMUTH, R.; SCHROETER, A. Molecular typing for *S. Enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 69-77, 1994.
- HUNTER, P. R. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 28, n. 9, p. 1903-1905, 1990.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. *Estatística da produção pecuária. Indicadores IBGE*. 2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acessado em: 10 out. 2010.
- KANG, Z.; JUNG, J. H.; KIM, S. H.; LEE, B. K.; LEE, D. Y.; KIM, Y. J.; LEE, J. Y.; WON, H. K.; KIM, E. H.; HAHN, T. W. Genotypic and phenotypic diversity of *Salmonella* Enteritidis isolated from chickens and humans in Korea. *The Journal of Veterinary and Medical Science*, Japão, v. 71, n. 11, p. 1433-8, 2009.
- KARIUKY, S.; GILKIS, C.; KIMARI, J.; MUYODI, J.; WAIYAKI, P.; HART, C. A. Analysis of *Salmonella* enterica serotype Typhimurium by phage typing, antimicrobial susceptibility and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Medical Microbiology*, London, v. 48, n. 11, p. 1037-1042, 1999.
- KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOGER, 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 Scientiarum – Health Science*, Maringá, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.
- LACONCHA, I.; LÓPEZ-MOLINA, N.; REMENTERIA, A.; AUDICANA, A.; PERALES, I.; GARAIZAR, J. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella* Enteritidis strains. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 40, n. 40, p. 27-34, 1998.
- 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. *Journal of Food Protection*, Des Moines, v. 66, n. 2, p. 324-327, 2003.
- OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. *Avian Diseases*, Atlanta, v. 45, n. 1, p. 61-69, 2001.
- OLIVEIRA, S. D.; FLORES, F. S.; SANTOS, L. R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella*

- Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, v. 97, n. 3, p. 297-305, 2005.
- PRAT, S.; FERNÁNDEZ, A.; FICA, A.; FERNÁNDEZ, J.; ALEXANDRE, M.; HEITMANN, I. Tipificación fágica de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias y avícolas en Chile. *Revista Panamericana de Salud Publica*, Washington D. C., v. 9, n. 1, p. 7-12, 2001.
- RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 296-299, 2007.
- SOUZA, R. B.; FERRARI, R. G.; MAGNANI, M.; KOTTWITZ, L. B. M.; ALCOCER, I.; TOGNIM, M. C. B.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 497-500, 2010.
- THRELFALL, E. J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews*, Amsterdam, v. 26, n. 2, p. 141-148, 2002.
- WEIDE-BOTJES, M.; KOBE, B.; SCHWARZ, S. Inter- and intra-phage type differentiation of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis isolates using molecular typing methods. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene*, Stuttgart, v. 288, n. 2, p. 181-193, 1998.
- WOO, Y. K. Finding the sources of Korean *Salmonella enterica* serovar enteritidis PT4 isolates by pulsed-field gel electrophoresis. *The Journal of Microbiology*, Warsaw, v. 43, n. 5, p. 424-429, 2005.
- ZHENG, J.; KEYES, C. E.; ZHAO, S.; MENG, J.; BROWN, E. W. Enhanced subtyping scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Emerging Infectious Diseases*, Atlanta, v. 13, n. 12, p. 1932-1935, 2007.

