

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
COORDENAÇÃO DO CURSO SUPERIOR DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

THALYTA MARINA BENETTI

**IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella enterica* EM SURTOS
ALIMENTARES**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2016

THALYTA MARINA BENETTI

**IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella enterica* EM SURTOS
ALIMENTARES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Tecnólogo de Alimentos da Coordenação do Curso Superior de Tecnologia de alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dra. Juliana Vitória M. Bittencourt

Co-orientador: Prof. Dra. Wanda Moscalewski Abrahão

PONTA GROSSA

2016



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Ponta Grossa
Departamento de Alimentos
Curso Superior de Tecnologia em Alimentos



TERMO DE APROVAÇÃO

IDENTIFICAÇÃO DE *Salmonella enterica* EM SURTOS ALIMENTARES

por

THALYTA MARINA BENETTI

Este trabalho de conclusão de curso foi apresentado em 12 de dezembro de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de tecnóloga em alimentos. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

JULIANA VITÓRIA M. BITTENCOURT
PROFA. ORIENTADORA

CLAUDIA WALUS STOCCO
MEMBRO TITULAR

SABRINA RODRIGUES
MEMBRO TITULAR

- O termo de aprovação assinado encontra-se na coordenação do curso -

Dedico este trabalho à minha família,
especialmente ao meu marido
Alexssander, e ao meu filho Pietro, que
logo estará em nossos braços.
AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus pela capacidade, força e por ter colocado em minha vida pessoas tão especiais, sem as quais certamente não chegaria até aqui!

À profa. Dra. Juliana Vitória M. Bittencourt, pela valiosa orientação, por partilhar seu conhecimento e acima de tudo, muito obrigado pela confiança, dedicação, incentivo e carinho durante estes anos.

À minha “mãe do coração”, profa. Dra. Wanda Moscalewski Abrahão, pela orientação na minha carreira acadêmica, demonstração de carinho, paciência, apoio e incentivo.

A todos os professores do Curso de Tecnologia em Alimentos Departamento da UTFPR, pela dedicação, conhecimentos e experiências transmitidas.

Aos membros participantes da banca pelo tempo empregado na análise, críticas e sugestões na melhoria do trabalho.

Aos meus amigos e colegas do Curso de Tecnologia em Alimentos, especialmente Jean Wald Garcia e Maria Luisa Cerri pelo carinho e amizade de sempre.

Aos meus amados e queridos pais, Rosangela e Douglas, ao meu marido, Alexssander, pelo carinho, incentivo e principalmente pela compreensão nos momentos de ausência, a vocês dedico este trabalho, pois lhes devo muito do que sei, e tudo o que sou. Muito obrigada!

Ao meu filho, Pietro, que me acompanhou semanalmente nas viagens a Ponta Grossa durante os dois primeiros trimestres de gravidez, pela paciência e tranquilidade, a você dedico não somente este título, mas todas as demais titulações, você é a maior conquista da mamãe! Te amo muito pequeno.

E à todos que de alguma forma colaboraram para a realização de mais esta graduação e que não foram aqui explicitamente citados, mas a quem expresseo o meu mais profundo agradecimento.

"O tempo é o melhor autor. Sempre encontra um final perfeito."

Charles Chaplin

RESUMO

BENETTI, Thalyta Marina. Identificação de *Salmonella enterica* em surtos alimentares. 2016. 27 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso Tecnologia de Alimentos - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2016.

Salmonella enterica é um importante patógeno responsável por toxi-infecções alimentares em humanos, considerado um dos maiores problemas de saúde pública no mundo em termos de morbidade e mortalidade. Este estudo foi realizado com o objetivo de estabelecer uma análise comparativa de cepas de *Salmonella enterica* em amostras clínicas e de alimentos a partir de possíveis eventos de surtos ocorridos entre os anos de 2005 a 2011, em municípios do Estado do Paraná. Verificou-se vários *fingerprints* de todos os isolados coletados das diferentes fontes estudadas. Observou-se que as bandas dos 66 isolados de *Salmonella enterica* foram similares entre os eventos e indicam que os isolados são relacionados, porém nem sempre idênticos. O estudo dos 14 possíveis eventos de surtos avaliados demonstrou que somente 4 eventos (28,6%) puderam ser confirmados como eventos de surtos, e que possivelmente os 10 eventos restantes tenham sido eventos negligenciados ou mesmo eventos isolados, não sendo permitido estabelecer o veículo de contaminação humana. A técnica genotípica empregada demonstrou-se como ferramenta útil para a elucidação de surtos. O estudo evidenciou que o serviço de Vigilância em Saúde do município de Curitiba - PR foi o principal notificador demonstrando a subnotificação ocorrida nos demais municípios de Estado. Os dados obtidos nessa pesquisa contribuem para orientar medidas de caráter preventivo e de controle de DTA a serem implementados pelos serviços de Vigilância em Saúde.

Palavras-chave: *Salmonella*; Surtos alimentares; Identificação molecular; Investigação epidemiológica.

ABSTRACT

BENETTI, Thalyta Marina. Identification of *Salmonella enterica* in food outbreaks. 2016. 27 sheets. Work of Conclusion Course Food Technology - Federal Technology University - Paraná. Ponta Grossa, 2016.

Salmonella enterica is an important pathogen responsible for food-borne infections in humans, considered one of the biggest public health problems in the world in terms of morbidity and mortality. This study was carried out with the objective of establishing a comparative analysis of *Salmonella enterica* strains in clinical and food samples from possible outbreak events occurring between the years 2005 and 2011 in municipalities of the State of Paraná. Several fingerprints of all the isolates collected from the different studied sources were verified. It was observed that the bands of the 66 isolates of *Salmonella enterica* were similar between the events and indicate that the isolates are related, but not always identical. The study of 14 possible outbreak events showed that only 4 events (28.6%) could be confirmed as outbreak events, and that possibly the 10 remaining events were ignored events or even isolated events, and it was not possible to establish the vehicle of human contamination. The genotypic technique employed proved to be a useful tool for the elucidation of outbreaks. The study evidenced that the Health Surveillance service of the city of Curitiba - PR was the main notified demonstrating the underreporting occurred in the other municipalities of the State. The data obtained in this research contribute to guiding preventive measures and control of DTA to be implemented by the Health Surveillance services.

Keywords: *Salmonella*; Food outbreaks; Molecular identification; Epidemiological research.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição, em porcentagem, dos locais em que ocorreram os possíveis eventos de surto de <i>Salmonella enterica</i> em estudo.....	17
Figura 2 - Análise por rep-PCR do Evento 1	20
Figura 3 - Análise por rep-PCR do Evento 10	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das amostras, locais e tempo em que ocorreram os possíveis eventos de surto de <i>Salmonella enterica</i> em estudo.....	16
Tabela 2 - Análise geral da percentagem de similaridade em os 14 possíveis eventos de surtos de <i>Salmonella enterica</i>	21

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
2.1 AMOSTRAGEM	16
2.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA.....	17
2.3 ANÁLISE GENOTÍPICA	17
2.4 ANÁLISE DE DADOS.....	18
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
4. CONCLUSÃO	25
5. REFERÊNCIAS.....	26

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o homem protagonizou uma transição no perfil das causas de morbi-mortalidade. No passado, as doenças infecto-contagiosas figuravam entre as principais causas de adoecimento e mortalidade da população. No entanto políticas públicas de saneamento básico, vacinação, criação de setores que monitoram a qualidade de matéria-prima alimentar entre outros, fizeram com que as doenças infecto-contagiosas dessem lugar as crônico-degenerativas, que atualmente mostram-se como principal causa de morbi-mortalidade. Contudo, práticas inadequadas de higiene ainda persistem, o que possibilitam, entre outros acontecimentos, a ocorrência de doenças e surtos na população. Nesse aspecto, o alimento representa um os principais veículos de transmissão de doenças e surtos na população (BARRETO, 2007).

O termo Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) é genérico, sendo utilizado para síndromes, geralmente acompanhadas por: anorexia, náuseas, vômitos e/ou diarreia. As DTA são atribuídas à ingestão de alimentos ou água contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados (ALMEIDA *et al.*, 2013).

Caracteriza-se como um surto de DTA o episódio em que duas ou mais pessoas apresentam doença semelhante após a ingestão de alimentos, inclusive água, de mesma origem e onde a evidência epidemiológica ou análise laboratorial apontam os alimentos e/ou água como veículos da doença. A incidência de doenças relacionadas ao consumo de alimentos cresce anualmente. A maioria dos casos de DTA não é notificada, pois muitos micro-organismos patogênicos presentes nos alimentos causam sintomas brandos, fazendo com que a vítima não busque auxílio médico (MARCHI *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2013).

O departamento de Saúde Pública responsável pelo controle e prevenção de doenças/agravos transmitidos por água e alimentos é a Vigilância Epidemiológica, que trabalha de forma integrada com outras instituições responsáveis pela vigilância da água, de alimentos e do meio ambiente, e com a assistência médica, visando reduzir doenças e outros agravos à saúde, eliminando ou controlando os fatores de risco de transmissão e dando importante contribuição para a garantia da segurança e qualidade dos alimentos e da água ingeridos pela população. Para a descrição de um surto de DTA, determinados fatores devem ser considerados: a situação, o número

de pessoas afetadas, o índice de ataque por idade, sexo e raça, o número de pessoas que não foram atingidas, o agente e o período de incubação, a natureza clínica da doença, o veículo alimentar e o modo de transmissão para os alimentos e para as vítimas (MARCHI *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.*, 2013).

Conforme com o último Boletim Epidemiológico divulgado pelo Sistema Único de Saúde (SUS), no Estado do Paraná, entre os anos de 1999 a 2004 ocorreram 219 surtos de DTAs, nos quais 1000 pessoas foram hospitalizadas e, estima-se que 8.663 ficaram doentes. Desse modo, pode-se estimar que no ano de 2000 o governo gastou R\$ 1.870.000,00 somente com internações devido às doenças transmitidas por alimentos (BRASIL, 2005)

As doenças decorrentes da infecção por *Salmonella* são um dos maiores problemas de saúde no mundo em termos de morbidade e mortalidade. A cada ano, no mundo, se estima que ocorram 93,8 milhões de casos de salmonelose, causando aproximadamente 155 mil mortes. A maioria destes casos ocorre através da ingestão de alimentos contaminados, principalmente aves e ovos (MAJOWICZ *et al.*, 2010). Conforme Bajpai, Baek e Kang (2012) as pessoas e os animais são direta ou indiretamente a fonte de contaminação dos alimentos com *Salmonella*, estando presentes no trato intestinal das aves e dos grandes animais de abate sem demonstrar sintoma algum de infecção.

O gênero *Salmonella* compreende duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *S. enterica* subdivide-se em seis subespécies, e compreende 2587 sorovariedades. Já a espécie *S. bongori* não possui subespécies e compreende 23 sorovariedades. As linhagens pertencentes à subespécie *S. enterica* são as com maior índice de isolamento em humanos, animais e alimentos, assim, as linhagens pertencentes à outras subespécies e à espécie *S. bongori* são responsáveis por somente 1 a 2 % dos isolados de *Salmonella* (GUIBOURDENCHE *et al.*, 2010; PULIDO-LANDÍNEZ *et al.*, 2013; VOSS-RECH *et al.*, 2015).

Devido a marcante importância de *Salmonella enterica* como causa de doença veiculada por alimentos, diversos métodos na esfera molecular têm sido aplicados em estudos epidemiológicos, com relevante capacidade discriminatória, permitindo complementarmente realizar a tipagem bacteriana (GUARD *et al.*, 2012; CAMPIONI, 2013).

Métodos como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE), método padrão-ouro para a análise comparativa entre espécies bacterianas, e a tipificação de

sequências multilocus (MLST) são específicos para uma espécie, demorados, ou pouco reprodutíveis, ou seja, são métodos que apresentam diferentes desvantagens (THOMPSON *et al.*, 1994; DEPLANO, 2011).

O sistema DiversiLab (DL) recentemente introduzido pela empresa bioMérieux supera potencialmente estas limitações. Esta técnica de tipagem e análise gênica e se baseia na repetitiva sequência de PCR (rep-PCR). O sistema DL é um rep-PCR semiautomatizado com um alto nível de padronização, em particular para o passo de eletroforese usando um Bioanalyzer (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA). Isto reduz os problemas de reprodutibilidade devido à variação nas condições de ensaio. O software de análise permite a comparação de padrões de produtos de amplificação individuais (padrões de pico), o que permite uma interpretação mais fácil dos padrões, mas também é gerada uma imagem de gel virtual. Os padrões podem ser armazenados em um banco de dados e usados para comparação (OLIVINDO *et al.*, 2009; DEPLANO, 2011).

Nesse contexto, a Vigilância Sanitária do Estado do Paraná e o respectivo laboratório prestador de serviço, Laboratório Central do Estado do Paraná, necessitam de ferramentas analíticas seguras para identificar os agentes de surtos de DTA e com isto estabelecer medidas capazes de eliminar, diminuir ou prevenir riscos e agravos à saúde individual e coletiva. Assim, este estudo foi realizado com o objetivo de estabelecer uma análise comparativa de cepas de *Salmonella enterica* em amostras clínicas e de alimentos a partir de possíveis eventos de surtos ocorridos entre os anos de 2005 a 2011, em municípios do Estado do Paraná.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRAGEM

Um total de 66 isolados de *Salmonella enterica* foram estudados neste trabalho, sendo que 25 isolados eram procedentes de amostras de alimentos, e 41 de amostras clínicas, estes pertencentes a 14 possíveis eventos de surtos. As cepas bacterianas utilizadas neste ensaio pertencem a coleção de culturas do Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN-PR), e são provenientes de amostras alimentares e de humanos de diferentes municípios do Estado do Paraná, Brasil, identificadas no período de 2005 a 2011, como demonstrado na Figura 1 e distribuídos de acordo com o apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das amostras, locais e tempo em que ocorreram os possíveis eventos de surto de *Salmonella enterica* em estudo.

	Ano	Local	Alimentos	Clinica	Total
Evento 1	2005	Curitiba	1	3	4
Evento 2	2005	Campo Mourão	1	1	2
Evento 3	2005	Campo Mourão	1	1	2
Evento 4	2005	Irati	5	1	6
Evento 5	2005	Curitiba	1	7	8
Evento 6	2005	Curitiba	1	1	2
Evento 7	2006	Francisco Beltrão	1	3	4
Evento 8	2006	Francisco Beltrão	1	1	2
Evento 9	2006	Curitiba	2	3	5
Evento 10	2007	Cascavel	2	10	12
Evento 11	2010	Curitiba	1	3	4
Evento 12	2010	Cascavel	1	2	3
Evento 13	2011	Curitiba	4	2	6
Evento 14	2011	Guarapuava	3	3	6

Fonte: O autor (2016)

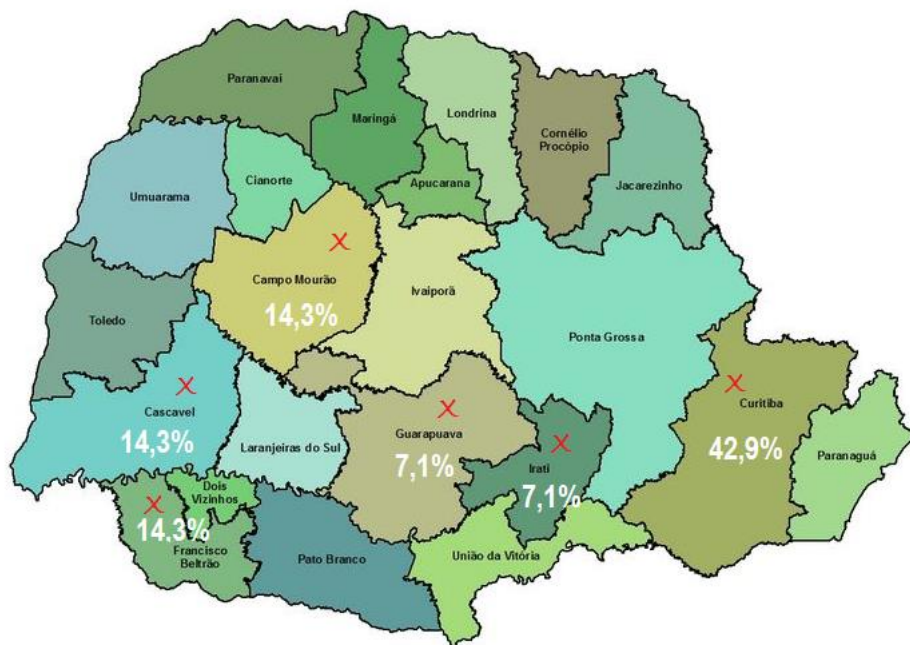


Figura 1 – Distribuição, em porcentagem, dos locais em que ocorreram os possíveis eventos de surto de *Salmonella enterica* em estudo.
 Fonte: O autor (2016)

2.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Os isolados estavam mantidos à temperatura de -80°C em pérolas para a estocagem de bactérias (Cryo bank, Laborclin, Brasil).

Para recuperação as cepas foram cultivadas tanto pelo Ágar Tripticase de Soja (TSA) como pelo Ágar Nutriente (Newprov, Brasil), ambas incubadas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 e 48 horas. Como forma de assegurar a obtenção de um cultivo puro do micro-organismo e uma identificação bioquímica correta, os isolados foram repicados nos meios de diferenciação seletivos Ágar Hectoen e Ágar XLD. Colônias isoladas foram identificadas utilizando a provas fenotípicas convencionais de sorotipagem.

2.3 ANÁLISE GENOTÍPICA

O sistema Diversilab® foi realizado após a extração e purificação do DNA pelo sistema MoBio Ultra-Clean™ Microbial DNA (MoBio Laboratories), seguindo as

recomendações do fabricante. As amplificações foram efetuadas no termocilador Veriti® (Life Technologies) utilizando o Diversilab® Salmonella kit. Os perfis de bandas obtidos através do analisador Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) foram analisados utilizando programa "web based" Diversilab (Biomerieux).

2.4 ANÁLISE DOS DADOS

A análise das similaridades entre as cepas foi baseada na presença ou ausência de bandas específicas na análise da reação de PCR, de modo que diferenças e similaridades entre as cepas foram analisadas automaticamente pelo software de acordo com o comportamento de migração das bandas dos produtos da reação de PCR. O programa "web based" Diversilab (Biomerieux) permitiu a comparação de padrões de produtos de amplificação individuais, e a interpretação mais fácil dos padrões, mas também foi gerada uma imagem de gel virtual. Os padrões gerados foram armazenados em um banco de dados para futuras avaliações.

As percentagens de similaridade foram calculadas pelo coeficiente de *Pearson Correlation*. Pode-se considerar que as cepas eram idênticas ou intimamente relacionadas quando a similaridade foi superior a 95%, enquanto que valores abaixo de 95% foram classificados como não relacionados (DEVULDER *et al.*, 2003; HIGGINS *et al.*, 2012; KOHLENBERG *et al.*, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A partir dos micro-organismos armazenados pode-se verificar que os modelos das bandas dos 66 isolados de *Salmonella enterica* foram similares entre os eventos e indicam que os isolados são relacionados, porém nem sempre idênticos, estes apresentados na Tabela 2. Por meio da técnica genotípica empregada foi possível estabelecer a comparação entre as cepas através de dois relatórios produzidos automaticamente, o dendograma e a semelhança de matriz.

Assim, por intermédio da análise do evento 1 pode-se exemplificar os relatórios produzidos pelo sistema DiversiLab®, Figura 2. Verificou-se pela semelhança de matriz que no evento 1 as similaridades que variavam entre 63,3% e 95,9%. A amostra SALM49 de origem clínica mostrou-se 95,9% de similaridade à amostra SALM1 de origem alimentar, o que permite inferir, considerando a similaridade genética, que provavelmente o alimento contaminado foi a fonte de contaminação para o paciente. Sendo que as demais amostras clínicas possuíram baixa similaridade com o a cepa alimentar, amostras SALM71 e SALM50, com similaridade de 86,1% e 63,3%, respectivamente, demonstrando que não se tratava exatamente de surto de DTA, pois somente um indivíduo foi acometido pelo alimento em análise apesar de os pacientes envolvidos terem apresentado doença semelhantes.

As DTA podem dar origem a surtos, estes definidos por episódios nos quais duas ou mais pessoas apresentam, em um mesmo período de tempo, sinais e sintomas semelhantes após a ingestão de um determinado alimento de mesma origem considerado contaminado por evidência clínica, epidemiológica e/ou laboratorial. (MARCHI *et al.*, 2011).

No evento 1 pode-se observar que as amostras clínicas, SALM49 e SALM71 apresentaram elevada similaridade, 94,7%, e nenhuma banda diferente entre si, contudo, quando comparadas a amostra alimentar a amostra SALM71 foi classificada como não relacionadas. A tipagem molecular (REP-PCR) permitiu detectar e diferenciar dois grupos (G1 e G2) e três padrões (P) (clones) distintos entre os 4 isolados de *Salmonella enterica* analisados neste evento. O grupo G2 foi o mais frequente com 3 isolados, enquanto que o grupo G1 foi representado por somente 1 isolado. Foi possível diferenciar dois padrões distintos [P1 e P2] dentro do grupo G1,

comprovante que a clonalidade entre as amostra clínica e de alimento, amostra SALM49 e SALM1, respectivamente.



Figura 2 – Análise por rep-PCR do Evento 1.
Fonte: O autor (2016)

Os eventos 2, 3, 6, 7, 8 e 11 demonstraram as máximas similaridades entre 94,7% e 80,8% e classificados como não relacionados, comprovando que não se tratava de um evento de surto, ou sugerem que as amostras alimentares não foram adequadamente coletadas.

De acordo com INCQS (2003) para a elucidação de casos de DTA, deve ser coletado as sobras dos alimentos suspeitos e efetivamente consumidos pelos afetados o mais rápido possível. Senão houver sobras os autores recomendam a coleta dos vasilhames onde as refeições estavam acondicionadas, a coleta de amostras do lote de matérias primas e ingredientes utilizadas na preparação das refeições, ou mesmo de amostras de refeições similares, preparadas posteriormente nas mesmas condições, o que muitas vezes acarreta um grande risco de não identificar o exato agente causal, como observado no presente estudo.

Alimentos contaminados, normalmente, têm aparência, odor e sabor normais e a população é pouco esclarecida sobre os perigos envolvidos com esse tipo de alimento. São fatores que dificultam, em casos de intoxicação alimentar, a identificação do alimento contaminado ingerido nas últimas refeições (MARCHI *et al.*, 2011).

Tabela 2 – Análise geral da percentagem de similaridade em os 14 possíveis eventos de surtos de *Salmonella enterica*.

	N ° do isolado	Amostra	Similaridade	
Evento 1	1	Clínica	95,9%	
	2	Alimento		
	3	Clínica		
	4	Clínica		
Evento 2	5	Clínica	94,7%	
	6	Alimento		
Evento 3	7	Clínica	83,7%	
	8	Alimento		
Evento 4	9	Alimento	99,0%	
	10	Alimento		
	11	Alimento		
	12	Alimento		
	13	Alimento		
	14	Clínica		
Evento 5	15	Clínica		
	16	Clínica		
	17	Clínica	>95,5%	
	18	Clínica		
	19	Clínica		
		20	Clínica	
		21	Clínica	
	22	Alimento		
Evento 6	23	Clínica	84,8%	
	24	Alimento		
Evento 7	25	Clínica	91,50%	
	26	Clínica		
	27	Alimento		
	28	Clínica		
Evento 8	29	Clínica	80,8%	
	30	Alimento		
Evento 9	31	Clínica	>98,0%	
	32	Clínica		
	33	Alimento		
	34	Alimento		
		35	Clínica	
Evento 10	36	Clínica	>98,7%	
	37	Clínica		
	38	Clínica		
	39	Clínica		
	40	Clínica		
	41	Clínica		
	42	Clínica		
	43	Clínica		
		44	Alimento	
		45	Alimento	
	46	Clínica		
	47	Clínica		
Evento 11	48	Clínica	91,60%	
	49	Clínica		
	50	Alimento		
	51	Clínica		
Evento 12	52	Clínica	99,40%	
	53	Clínica		
	54	Alimento		
Evento 13	55	Clínica	96,30%	
	56	Clínica		
	57	Alimento		
	58	Alimento		
	59	Alimento		
	60	Alimento		
Evento 14	61	Alimento		
	62	Clínica		
	63	Clínica	99,50%	
	64	Clínica		
	65	Alimento		
	66	Alimento		

No evento 4 as semelhanças entre os *fingerprints* das amostras alimentares com a amostra clínica variaram de 92,1% a 94,2% (dados não apresentados), contudo, clones somente foram observados entre as amostras alimentares. Todavia, nos eventos 5, 12 e 14 os *fingerprints* idênticos foram observados somente entre as amostras clínicas com máximas similaridades superiores a 95,5%.

No evento 10, Figura 3, oito das dez amostras clínicas apresentaram elevada similaridade entre si, 99,0%, com dendograma demonstrando que todos os isolados apresentaram as mesmas bandas, assim como, as duas amostras de alimentos, demonstraram-se idênticas geneticamente, com similaridade de 99,4%. A tipagem molecular detectou um grupo único (G1) e dois padrões distintos dentre estes 10 isolados de *Salmonella enterica* acima descritos, foi possível diferenciar dois padrões distintos [P1 e P2] dentro do grupo G1, separando as o grupo dos isolados de origem alimentar e de origem clínica. Apesar da distinção, os isolados são relacionados, com similaridade entre 86,2% e 94,1%, e idênticos entre si, quando avaliado a amostra alimentar SALM11 e a amostra clínica SALM80.

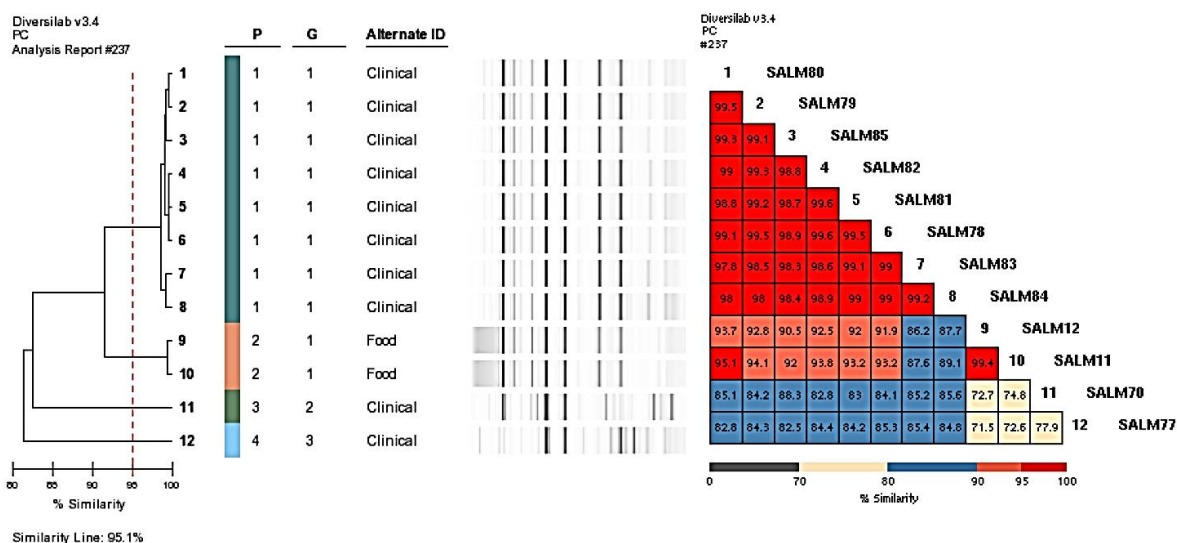


Figura 3 – Análise por rep-PCR do Evento 10.
Fonte: O autor (2016)

Similaridades genéticas superiores a 95% entre amostras de origem alimentar e de origem clínica, também foram observadas nos eventos 9 e 13, além do evento 1 anteriormente descrito. Estes ocorridos no município de Curitiba – PR, o principal notificador, evidenciando a subnotificação ocorrida nos demais municípios de Estado. Através desta análise podemos presumir que a contaminação humana nestes eventos foi oriunda dos alimentos analisados, e que procedimentos de higienização e cocção

adotados devem ser reavaliados, e orientado medidas de caráter preventivo e de controle de DTA.

Episódios de surtos de DTA ocorrem dentro das próprias residências dos indivíduos envolvidos, seja por erros na conservação dos alimentos, ou mesmo, nas boas práticas de preparo (LOPES *et al.*, 2007). De acordo com dados de Paraná (2011), 47,7% das situações notificadas quanto ao local de preparo e de ingestão do alimento envolvido no surto foram as residências. Em estudo realizado por Almeida *et al.* (2013) caracterizando o perfil epidemiológico dos surtos de DTA ocorridos na Região Metropolitana de Curitiba, Estado do Paraná, Brasil, no período de 2005 a 2008, o principal local de ingestão do alimento contaminado também foi a residência do indivíduo acometido, responsável por 36,17% (17/47) das notificações seguido dos restaurantes com 34,04% (16/47) dos casos. Surtos nos domicílios também foram os locais mais frequentes (47,5%) na pesquisa realizada no município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, no período de 1995 a 2007, seguidos dos ocorridos em estabelecimentos comerciais (30,5%) (MARCHI *et al.*, 2011)

Com relação aos micro-organismos identificados nas amostras das diferentes análises de surtos ocorridos na região Sul do Brasil, os resultados são discrepantes, apontaram como agentes *Salmonella*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e o indicador sanitário *Escherichia coli*. Os alimentos mais frequentemente envolvidos são a maionese, os ovos, o leite e as frutas, verduras e legumes (MARCHI *et al.*, 2011; ALMEIDA *et al.* 2013) .

Dentre os fatores que mais contribuem para a ocorrência de surtos de DTA estão a matéria-prima contaminada antes do preparo e a matéria-prima contaminada por bactérias durante o preparo envolvendo os manipuladores, e casos de contaminação cruzada. As técnicas inadequadas incluem o processamento impróprio do alimento por meio do calor incluindo o reaquecimento feito deficiente, os quais permitem a sobrevivência dos micro-organismos, além da conservação inadequada pelo frio e o intervalo de tempo longo entre o preparo e o consumo implica na multiplicação bacteriana (AMSON *et al.*, 2006).

Os critérios de confirmação dos casos de surtos de DTA basearam-se em achados clínicos epidemiológicos e algumas vezes laboratoriais. A falta de notificação é um problema constante na maioria dos países e as taxas de incidência só correspondem aos casos confirmados em laboratório. Em consequência, a verdadeira taxa de infecção é maior do que o número de casos notificados. A investigação dos

surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) é desafiadora, assim, para a Vigilância em Saúde é fundamental a identificação de grupos e fatores de risco associados às DTA.

O presente estudo apresentou algumas limitações, somente 28,6% (4/14) eventos puderam ser confirmados como eventos de surtos. É possível que falhas principalmente na seleção da amostra alimentar tenham ocorrido, por falta de preparo do profissional, ou mesmo, pelos restos alimentares terem sido descartados. Outro fato que pode ter contribuído e o longo período entre a coleta e a análise e o acondicionamento a temperaturas superiores ao recomendado, o que dificulta a sustentação do diagnóstico e facilita a manutenção de cepas mais adaptadas.

Apesar das limitações, que não correspondem a técnica molecular, os dados obtidos nessa pesquisa demonstram que o sistema de tipagem epidemiológica, sistema Diversilab, é uma adequada ferramenta para confirmar investigações de surtos e delinear comportamentos de transmissão de um ou mais clones epidêmicos, assim como, para testar hipóteses sobre fontes e veículos de transmissão destes clones e para monitorar reservatórios de organismos epidêmicos.

4. CONCLUSÃO

O estudo dos 14 possíveis eventos de surtos avaliados em diferentes municípios do Estado do Paraná no período estudado (2005 a 2011) demonstrou que somente 4 eventos (28,6%) puderam ser confirmados como eventos de surtos, e que possivelmente os 10 eventos restantes tenham sido eventos negligenciados ou mesmo eventos isolados, não sendo permitido estabelecer o veículo de contaminação humana. A técnica genotípica empregada demonstrou-se como adequada para a elucidação de surtos. O estudo evidenciou que o serviço de Vigilância em Saúde do município de Curitiba - PR foi o principal notificador demonstrando a subnotificação ocorrida nos demais municípios de Estado.

Os dados obtidos nessa pesquisa contribuem para orientar medidas de caráter preventivo e de controle de DTA a serem implementados pelos serviços de Vigilância em Saúde.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. C.; PAULA, C. M. S.; SVOBODA, W. K.; LOPES, M. O.; PILONETTO, M. P. ABRAHÃO, W. M. GOMES, E. C. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 34, n. 1, p. 97-106, jan./jul. 2013.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

BAJPAI, V.K.; BAEK, K.-H. KANG, S.C. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, 2012.

BARRETO, T. L. Perfil epidemiológico dos curtos de toxinfecções alimentares no município de Limeira, SP. Dissertação. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo. 120p. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999 – 2004. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Brasília, DF, n. 6, p. 1, 2005. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/julho/15/Ano05-n06-ve-dta-brasil-completo.pdf> Acesso em 18 de novembro de 2016.

CAMPIONI, F. *et al.*, MLVA typing reveals higher genetic homogeneity among *Salmonella* Enteritidis strains isolated from food, human and chickens in Brazil in comparison the North American Strains. **International Journal of Food Microbiology**, v. 162, n. 2, p. 174-181, 2013.

DEPLANO, A; DENIS, O; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H; RYCK, R; STRUELENS, M. J; HALLIN, M. Controlled performance evaluation of the DiversiLab repetitive-sequence-based genotyping system for typing multidrug-resistant health care-associated bacterial pathogens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 10, p. 3616–3620, 2011.

DEVULDER, G.; PERRIÈRE, G.; BATY, F.; FLANDROIS, J.P. BIBI, a bioinformatics bacterial identification tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1785-1787, 2003.

GUARD, J. *et al.* Comparison of dkgB-linked intergenic sequence ribotyping to DNA microarray hybridization for assigning serotype to *Salmonella enterica*. **FEMS microbiology letters**, v. 337, n. 1, p. 61-72, 2012.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X. Supplement 2003-2007 (Nº47)

to the White-Kauffmann – Le Minor scheme. *Research in Microbiology*, Paris, v. 161, p. 26-29, 2010.

HIGGINS, P. G.; HUJER, A. M.; HUJER, K. M.; BONOMO, R. A.; SEIFERT, H. Interlaboratory reproducibility of DiversiLab rep-PCR typing and clustering of *Acinetobacter baumannii* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, v. 61, p.137–141, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE-INCQS. **Manual de Coleta de Amostras**. Rio de Janeiro, 2003.

KOHLBERG A.; BRÜMMER S.; HIGGINS P. G.; SOHR D.; PIENING B. C.; DE GRAHL C.; HALLE E.; RÜDEN H.; SEIFERT H. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. **J Med Microbiol**, v.58, p. 1499–1507, 2009.

LOPES, M.; GALHARDO, J. A.; OLIVEIRA, J. T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S. F.; MULLER, E. E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. **Semina**, v. 28, n. 3, p. 465-476. 2007

MAJOWICZ, S.E. *et al.* The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Disease**, v. 50, n. 6, p. 882-889, 2010.

MARCHI, D. M.; BAGGIO, N.; TEO, C. R. P. A. I Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos no Município de Chapecó, Estado de Santa Catarina, Brasil, no período de 1995 a 2007. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 401-407, 2011.

OLIVINDO, C.S.; CHAPAVAL, L.; VILLARROEL, A.B.S; ALVES, F.S.F; SOUSA, F.G.C; FERNANDES, F.E.P. Detection of *Staphylococcus aureus* using the REP-PCR technique to monitor goat milk quality. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.38, n.7, p.1317-1321, 2009.

PULIDO-LANDÍNEZ, M. *et al.* Assignment of serotype to *Salmonella enterica* isolates obtained from poultry and their environment in Southern Brazil. **Letters in applied microbiology**, v. 57, n. 4, p. 288-294, 2013.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v. 11, n. 22, p. 4673-80, 1994.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.L.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEÃO, J.A.; RODRIGUES, D.P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v.94, n. 3, p. 433-441, 2015.