

MARCADORES EPIDEMIOLÓGICOS DE *Salmonella typhimurium* e *Salmonella agona*.

Sueli Aparecida FERNANDES; Ana Terezinha TAVECHIO; Suzel N.NEME; Chifumi T. CALZADA;
Angela Maria G. DIAS; Leda K. NAKAHARA; Jose Carlos de OLIVEIRA; Kinue IRINO & Augusto E. TAUNAY

RESUMO

Entre as cepas de *S. typhimurium* e *S. agona* isoladas no período 1971-1987 foram caracterizados os biotipos, colicínios e antibiogramas de 734 cepas de *S. typhimurium* e 631 de *S. agona*. As 734 cepas de *S. typhimurium* foram classificadas em 65 biotipos com o predomínio dos biotipos 1a com 28,34%, 1b com 29,84% e 9bi com 18,25%. Com relação a *S. agona*, o biotipo 1a com 87,16% representou entre nós o clone amplamente disseminado. Foram encontradas freqüências baixas de cepas colicínogênicas, entretanto, a colicíniose parece ser um bom método quando aplicada ao estudo de amostras homogêneas provenientes de surtos. Acentuada multirresistência aos agentes antimicrobianos, foi observada principalmente entre aquelas cepas de origem humana quase sempre representadas por cepas hospitalares.

UNITERMOS: *S. typhimurium*; *S. agona*, biotipos; colicínios; resistência antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

As salmoneloses podem ser consideradas como as mais freqüentes das zoonoses e na opinião de EDWARDS¹⁷ são as únicas infecções por enterobactérias com tendência em aumentar, mesmo nos países com bom saneamento básico.

Na Europa, o consumo de aves e suínos tem sido apontado como responsável pela toxinfecção^{27,46,47}. Nos Estados Unidos, a freqüência anual é estimada entre 800.000 e 3.700.000 casos de salmoneloses por ano¹².

Em São Paulo, somente depois de 1945, quando a técnica de isolamento e identificação das salmonelas passou a ser feita de forma adequada, identificando-se os sorotipos prevalentes na região, é que foi possível avaliar de forma mais correta o problema das salmoneloses^{28,41,42}. Constatou-se que a *S. typhimurium*, sorotipo mais freqüente em quase todo mundo, não era prevalente em nossa região.

Em 1968 iniciou-se uma verdadeira epidemia de toxinfecções por salmonelas, muitos dos casos

com invasão sistêmica, e de onde praticamente só era isolada a *S. typhimurium*. Ao mesmo tempo, foi constatada a existência de focos de infecção em unidades de três hospitais, responsáveis por numerosos dos casos de infecção hospitalar⁴³.

A partir de 1977^{11,31} a *S. agona*, sorotipo ainda desconhecido na região, teve sua presença assinalada, passando desde logo a ser o segundo sorotipo por ordem de freqüência a ser isolado, com sua presença também assinalada em enfermarias de pediatria²⁰.

Este sorotipo, descrito em 1961²¹ e de ocorrência rara, disseminou-se de forma explosiva em vários países, passando a ser importante sorotipo de infecções humanas e animais em diferentes países.

Considerando a importância de *S. typhimurium* e *S. agona* como responsáveis por infecções humanas, objetivou a presente verificação, caracterizar os clones destes sorotipos disseminados em habitats diversos, através da determinação de seus biotipos, colicínios e marcas de resistência aos

agentes antimicrobianos, para identificar a origem e disseminação da infecção, bem como implementar medidas no seu controle.

MATERIAL E MÉTODOS

Cepas bacterianas estudadas

Entre as cepas isoladas no período de 1971-1987, foram selecionadas aleatoriamente 734 de *S. typhimurium*, sendo 336 de fezes, 111 de sangue, 94 de líquido cefalorraquidiano (LCR), 43 de secreções, 40 de urina, 21 de origem humana não especificada, 30 de alimentos, 20 de ambiente, 15 de água de esgoto, 9 de vísceras de animais, 6 de água, 6 de ração para animais e 3 de cateter. Com relação às 631 cepas de *S. agona*, 459 eram provenientes de fezes, 19 de sangue, 16 de LCR, 9 de urina, 8 de secreções, 9 de origem humana indeterminada, 49 de alimentos, 33 de ração para animais, 14 de água de esgoto, 7 de lodo digerido, 6 de fezes de pássaros e 2 de mosca.

Das cepas acima relacionadas, 146 cepas de *S. typhimurium* e 121 de *S. agona* foram estudadas quanto à resistência aos agentes antibacterianos.

Cepas padrões para colicintipagem

As cepas padrões indicadoras, abaixo relacionadas, foram recebidas do Departamento de Bacteriologia da Universidade de Dundee, Escócia.

CL 104	<i>E.coli</i> , indicadora de colicinogenia
BZB 1011	<i>E.coli</i> , indicadora de colicinogenia
CL 135	<i>E.coli</i> K12, resistente a colicinas B e M
CL 136	<i>E.coli</i> K12, resistente a colicina E1
CL 137	<i>E.coli</i> K12, resistente a colicina E2
CL 146	<i>E.coli</i> K12, resistente a colicina K
CL 148	<i>E.coli</i> , resistente a colicina E2
CL 150	<i>E.coli</i> , resistente a colicina I
CL 152	<i>E.coli</i> , resistente a colicinas I e E2
CL 184	<i>E.coli</i> , resistente a colicina I
CL 234	<i>E.coli</i> , resistente a colicina Ib
CL 235	<i>E.coli</i> , resistente a colicina Ia

1 - Biotipia

O método padronizado por DUGUID et alii¹⁶ foi utilizado para a caracterização dos biotipos e subtipos analisando o conjunto de reações de fermentação de carboidratos, crescimento em água peptonada contendo ácidos orgânicos, utilização de substratos carbonados em meio mínimo e presença

de fímbrias do tipo 1. Ao sistema foram acrescentados os testes de fermentação da lactose e de ONPG (orto nitro fenil-D-galactopiranosídeo).

Os meios de cultura e substratos utilizados na biotipia foram:

- Meio de Bitter⁸ contendo D-xilose e L-ramnose na concentração final de 0.5 a 1.0%.

- Água peptonada contendo azul de bromotimol como indicador de pH e acrescida dos substratos: meso inositol, trealose, D-xilose, L-ramnose, glicose e lactose na concentração final de 0.5 a 1.0%.

- Teste de ONPG (orto nitro fenil-D-galactopiranosídeo) realizado segundo LE MINOR e BEN HAMIDA²⁴.

- Meio de Stern³⁹ contendo glicerol na concentração final de 1.0%.

- Água peptonada sem indicador de pH acrescida de ácido tartárico nas formas d, L e i, na concentração final de 1.0%.

- Meio mínimo de Davis¹⁴ contendo 0.3% de glicose; 0.5% de glicerol; 0.25% de citrato de sódio; 0.5% de d-tartarato; 0.5% de l-tartarato; 0.5% de i-tartarato; 0.25% de citrato de sódio mais 0.5% de i-tartarato; e 0.5% de glicerol mais 0.5% de i-tartarato.

Suspensões bacterianas contendo aproximadamente 1×10^9 bactérias/ml foram inoculadas nestes meios de cultura e a seguir incubados a 37°C, em estufa. As leituras foram realizadas após 18-24 horas de incubação com observações diárias por até 40 dias. A fermentação do meso-inositol foi verificada também a 25°C após 48 horas de incubação. O crescimento em meio mínimo foi observado após 48 horas de incubação a 37°C.

ATIVIDADE HEMAGLUTINANTE

O método de DUGUID^{15,16} foi empregado para verificar a capacidade hemaglutinante das cepas. Culturas em meio líquido, com 48 horas de incubação a 37°C foram inativadas com formol a 0.1% e a seguir centrifugadas a 5.000 rpm por 15 minutos. O sedimento bacteriano assim obtido foi testado com suspensão de hemácia de cobaia a 2.0% e a sensibilidade da atividade hemaglutinante à

manose, indicativo da presença de fimbrias do tipo 1 foi observada com hemácias a 2.0% contendo 0.5% de D-manose. As cepas foram classificadas como não hemaglutinantes quando, após seis subcultivos sucessivos, nada se alterava.

2 - Colicinotipia

A produção de colicinas foi verificada pela técnica de camada dupla, recomendada por BARKER².

Todas as cepas foram semeadas em forma de "spot" em 2 placas contendo ágar comum e após incubação a 37°C por 24 horas, as superfícies do ágar foram expostas ao vapor de clorofórmio por 15 min. e em seguida expostas ao ar por mais 15 min. Cada placa foi inundada por uma camada fina de ágar semisólido, contendo uma cultura das cepas indicadoras *E.coli* CL 104 e BZB 1011, às quais são sensíveis a maioria das colicinas. Após 24 hs. de incubação, as cepas produtoras de colicinas, apresentavam zonas de inibição do crescimento das cepas indicadoras.

A determinação dos tipos de colicinas produzidas foi realizada utilizando-se da mesma metodologia, através de cepas indicadoras com resistência a colicinas específicas.

3- Determinação das marcas de resistência aos agentes antimicrobianos

As marcas de resistência foram determinadas segundo o método descrito por BAUER et alii⁵, empregando-se discos da marca CECON, impregnados com os seguintes agentes antimicrobianos: ácido nalidixico (AN) 30 mcg; amicacina (AM) 30 mcg; ampicilina (AP) 10 mcg; carbenicilina (CR) 10 mcg; cefalotina (CF) 30 mcg; cefoxitina (CT) 30 mcg; colistina (CL) 10 mcg; cloranfenicol (CO) 30 mcg; fosfomicina (FO) 50 mcg; gentamicina (GN) 10 mcg; kanamicina (KN) 30 mcg; netilmicina (NM) 30 mcg; sulfonamida (SF) 300 mcg; sulfatrim (ST) 25 mcg; tobramicina (TB) 10 mcg e tetraciclina (TT) 30 mcg.

RESULTADOS

Foram identificados 65 biotipos entre as cepas de *S. typhimurium* com predominância dos tipos 1a com 28,34%, 1b com 29,84% e 9bi com 18,25% (Tabela 1). Estes biotipos foram predominantes entre todas as cepas estudadas. Os 62 biotipos restantes apresentavam uma frequência variando de 0,13 a 3,95%.

Em relação a *S. agona* foram determinados 16 biotipos com o predomínio do biotipo 1a com 87,16%. Os 15 biotipos restantes foram de ocor-

Tabela 1

Distribuição dos biotipos de *S. typhimurium*

		BIOTIPOS				
	ORIGEM	1a	1b	9bi	outros	TOTAL
HUMANA	Fezes	103	94	57	82	336
	Líquido cefalorraquidiano	29	32	15	18	94
	Sangue	14	46	33	18	111
	Urina	07	15	07	11	40
	Secreções	09	15	14	05	43
	Indeterminada	11	02	0	08	21
	TOTAL PARCIAL		173	204	126	142
NÃO HUMANA	Alimento	15	02	02	11	30
	Ambiente	06	06	02	06	20
	Esgoto	04	04	0	07	15
	Vísceras	04	02	01	02	09
	Ração	05	0	0	01	06
	Água	01	01	0	04	06
	Cateter	0	0	03	0	03
TOTAL PARCIAL		35	35	08	25	89
TOTAL GERAL		208 (28,34%)	219 (29,84%)	134 (18,25%)	173 (23,57%)	734

rência rara, representando freqüência de 0,15 a 2,53%. (Tabela 2)

É importante ressaltar que entre as cepas de *S. typhimurium*, 12,68% eram fermentadoras rápidas (24 horas) da lactose, 38,34% fermentadoras tardias (3-10 dias) e 48,98% eram não fermentadas. Todas as cepas fermentadoras da lactose (rápidas e tardias) apresentaram o teste de ONPG positivo.

A incidência de cepas colicinogênicas foi de 1,51% para *S. typhimurium* cujos tipos de colicinas foram Ia (72,72%), Ib (18,18%) e E1 (9,1%). Para *S. agona*, a incidência foi de 3,96% de cepas colicinogênicas representadas por Ib (44%), Ia (32%), E2 (20%) e B com M (4%).

O estudo da atividade dos agentes antimicrobianos demonstrou que todas as cepas foram sensíveis a colistina e, a quase totalidade delas, resistentes a sulfonamida e a sulfatrim.

Na Tabela 3 observa-se a elevada multiresistência a agentes antimicrobianos das cepas de *S. typhimurium* e *S. agona*, variando de acordo com a origem das amostras.

DISCUSSÃO

Com o advento da sorotipagem ficou demons-

trada grande diversidade antigênica existente entre os membros do gênero *Salmonella*²⁵. Aos sorotipos já bem estabelecidos, novos vêm sendo incorporados e atualmente no esquema antigênico das salmonelas constam mais de 2.200 sorotipos.

Os sorotipos são utilizados como importantes marcadores no estudo de sua prevalência, entretanto a existência de cepas e clones pertencentes a um mesmo sorotipo, torna este marcador, muitas vezes, insuficiente para o estudo epidemiológico das salmoneloses.

Marcadores como biotipos, fagotipos, colicinotipos, antibiotipos, e mais recentemente perfil de plasmídeo, têm sido utilizados com sucesso no estudo de surtos de infecções por diferentes sorotipos de *Salmonella*^{2,9,10,22,23,26,35,37,40,44,45}.

Estes marcadores são importantes no estudo do comportamento de um clone após a sua introdução em um determinado ambiente, principalmente hospitais infantis, onde a sua persistência pode ser detectada pela seqüência de casos onde estejam presentes.

Relatos de alguns autores têm demonstrado que determinados sorotipos podem ser diferenciados em vários biotipos^{1,3,4,13,36}

Nas nossas verificações, identificamos diversi-

Tabela 2

Distribuição dos biotipos de *S. agona*

		BIOTIPOS			
ORIGEM		Ia	Ib	outros	Total
HUMANA	Fezes	393	16	50	459
	Sangue	14	0	05	19
	Urina	08	0	01	09
	Secreções	08	0	0	08
	Líquido cefalorraquidiano	13	0	03	16
	Indeterminado	08	0	01	09
TOTAL PARCIAL		444	16	60	520
NÃO HUMANA	Alimento	48	0	01	49
	Ração	30	0	03	33
	Esgoto	13	0	01	14
	Lodo	07	0	0	07
	Fezes	06	0	0	06
	Mosca	02	0	0	02
TOTAL PARCIAL		106	0	05	111
TOTAL GERAL		550 (87,16%)	16 (2,54%)	65 (10,30%)	631

Tabela 3
Resistência aos agentes antimicrobianos das cepas de *S. typhimurium* e *S. agona*

Nº de marcas	<i>S. typhimurium</i>		<i>S. agona</i>	
	Origem humana Nº/%	Outras origens Nº/%	Origem humana Nº/%	Outras origens Nº/%
2	0(0,00)	0(0,00)	6(9,53)	9(15,52)
3	2(1,68)	1(3,71)	9(14,28)	20(34,48)
4	3(2,52)	3(11,11)	5(7,94)	16(27,59)
5	8(6,72)	3(11,11)	3(4,76)	7(12,07)
6	10(8,41)	3(11,11)	2(3,17)	2(3,45)
7	4(3,36)	2(7,41)	4(6,35)	0(0,00)
8	10(8,41)	1(3,71)	4(6,35)	0(0,00)
9	11(9,24)	1(3,71)	2(3,17)	1(1,72)
10	8(6,72)	0(0,00)	15(23,81)	2(3,45)
11	6(5,04)	4(6,35)	4(6,35)	1(1,72)
12	21(17,65)	3(11,11)	6(9,53)	0(0,00)
13	9(7,56)	3(11,11)	2(3,17)	0(0,00)
14	5(4,21)	1(3,71)	1(1,59)	0(0,00)
15	18(15,12)	2(7,40)	0(0,00)	0(0,00)
16	4(3,36)	0(0,00)	0(0,00)	0(0,00)
Total	119	27	63	58

dade bioquímica (65 biotipos) entre as cepas de *S. typhimurium* com predomínio de dois biotipos primários, 1 e 9, como também havia sido verificado por DUGUID et alii¹⁶.

Segundo BARKER & OLD⁴ esta grande variação bioquímica existente neste sorotipo seria a resultante de mutações cromossômicas, aquisição ou perda de bacteriófagos, ou de plasmídios, de um ótipo ancestral, provavelmente biotipo 1a.

Clones pertencentes aos biotipos 1 e 9 estão amplamente disseminados no nosso meio. Estes clones de *S. typhimurium*, dotados de características particulares de virulência, devem ter sido, desde a sua introdução, responsáveis pela maioria das infecções que vem ocorrendo em nosso ambiente.

Em 1973, PESSOA³⁰ identificou uma variante de *S. typhimurium* fermentadora da lactose. Este clone disseminou-se rapidamente, e em São Paulo, nos anos subseqüentes, foi predominante entre as cepas isoladas de infecções humanas, tendo sido relatado em 1978, por PESSOA et alii^{32,34} sua estreita correlação com os ambientes hospitalares. Estas cepas, isoladas na década de 70, portadores de plasmídio responsável pela fermentação da

lactose, foram os agentes de graves epidemias e representou na amostragem estudada 51,66% das cepas. Nos nossos achados, foi possível verificar que entre as cepas, não provenientes de infecções humanas, nenhuma adquiriu a capacidade de desdobrar a lactose, com ONPG negativo, caracterizando assim a existência de um diferente biotipo de *S. typhimurium*.

O clone FIRN (fímbria, inositol e ramnose negativos), segundo DUGUID et al.¹⁶ e BARKER⁴, mundialmente disseminado, não representou o tipo freqüente entre nós. Entretanto, o clone FIN (fímbria e inositol negativos), fermentador da ramnose, foi de ocorrência comum (16%) entre as nossas cepas.

Considerando o aparecimento da *S. agona* como um fato ainda recente e o seu comportamento bioquímico uniforme, com o predomínio de um único clone pertencente ao biotipo 1a, devemos admitir que este sorotipo disseminado em todo o mundo ainda não sofreu variações marcantes no seu patrimônio genético.

Comparando com a variação bioquímica ocorrida entre as cepas de *S. typhimurium*, pode-se considerar reduzido o número de biotipos encontrados entre as cepas de *S. agona*. Entretanto, no decorrer de alguns anos após a sua disseminação, a *S. agona* já se diferenciou em 16 biotipos e o seu grande potencial de diversificação sugere uma constante vigilância para surpreender o aparecimento de novos tipos.

Em cepas de *S. typhimurium*, provenientes de um surto hospitalar¹⁹ e incluídas neste estudo, verificamos pertencerem ao tipo colicinogênico 1a, representando um importante marcador na detecção da fonte de contaminação e disseminação naquele hospital.

Ainda, os resultados obtidos com a colicinotipia sugerem que este método seja aplicado ao estudo de casos particulares, como epidemias hospitalares com amostras homogêneas quanto a origem, tempo e local de isolamento.

Outro fato importante, relativo às infecções por salmonelas, tem sido a multirresistência aos agentes antimicrobianos, ocasionada pelo uso indiscriminado dessas substâncias na terapêutica e profilaxia humana e veterinária. Esta resistência possivelmente tende a um crescimento ainda maior

dada a prática, atualmente muito comum, da adição de antibióticos em rações para animais, como promotores do crescimento^{6,7}.

Estudos sobre a resistência aos agentes antimicrobianos demonstram que a grande maioria das cepas isoladas das infecções humanas são multirresistentes, conseqüente da pressão seletiva e contínua na propagação de cepas resistentes que colonizam os ambientes hospitalares^{18,29,33,38}.

Nos últimos anos a maioria das infecções em berçários e hospitais infantis de São Paulo tem sido causada por cepas multirresistentes de *S. typhimurium*^{18,19,33}.

Neste estudo verificou-se que a aquisição da resistência aos agentes antibacterianos tem ocorrido de forma progressiva no decorrer dos anos, conforme mostram os dados não publicados existentes na seção de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

Na Tabela 3, podemos verificar que 95,80% das cepas de *S. typhimurium* isoladas de infecções humanas foram resistentes para 5 até 16 antimicrobianos. Cepas de outras origens, 85,19%, provenientes de ambiente hospitalar, também foram resistentes para 5 ou mais antimicrobianos. Considerando que a maioria dessas amostras são de origem hospitalar, esses dados mostraram que ambientes hospitalares representam fontes de cepas epidêmicas multirresistentes de *S. typhimurium*.

Com relação a *S. agona*, podemos constatar que em cepas humanas de origem hospitalar houve também um aumento da resistência, onde 77,59% das amostras foram resistentes para 5 a 14 antimicrobianos. No entanto, em cepas de outras origens, verificou-se que 93,10% das cepas foram resistentes a apenas 2 a 4 antimicrobianos. Considerando que *S. agona* teve seu relato em nosso meio pela primeira vez em 1974³¹, esses resultados reforçam mais uma vez a influência exercida pelo uso de antibióticos na seleção de salmonelas resistentes, principalmente em ambientes hospitalares.

No Brasil, milhares de pessoas são atingidas por infecções por salmonelas, sendo que os hospitais representam os ambientes muito favoráveis à ocorrência de graves infecções^{20,33}.

Do que nos foi dado observar, o controle das salmoneloses só será possível com a implantação

de sistemas de vigilância com uma constante monitorização dos casos, na área de higiene alimentar, veterinária e humana, através da completa caracterização dos clones pelos seus marcadores epidemiológicos.

SUMMARY

Epidemiological markers of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella agona*

Among *S. typhimurium* and *S. agona* strains isolated during the period from 1971 to 1987, the biotypes, colicine types and resistance patterns were determined for 734 *S. typhimurium* and 631 *S. agona* strains. Among 734 *S. typhimurium* strains 65 biotypes were disclosed with prevalence of biotypes 1a (28,34%), 1b (29,84%) and 9bi (18,28). Concerning *S. agona*, the biotype 1a represented by 87,16%, was the commonest clone among our strains. Although colicine typing added little information to characterize these serotypes, it should be useful when applied in epidemiological study of outbreaks. It was observed multiply antimicrobial resistance mainly among human strains, particularly from nosocomial origins.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARKER, R.M. & OLD, D.C. - Biotyping and colicinotyping of *S. typhimurium* strains of phage type 141 isolated in Scotland. J. med. Microbiol., 12: 265-276, 1979.
2. BARKER, R.M. - Colicinogeny in *S. typhimurium*. J. gen. Microbiol., 120: 21-26, 1980.
3. BARKER, R.M.; OLD, D.C. & TYC, Z. - Differential typing of *Salmonella agona*: type divergence in a new serotype. J. Hyg. (Lond.), 88: 413-423, 1982.
4. BARKER, R.M. & OLD, D.C. - The usefulness of biotyping in studying the epidemiology and phylogeny of salmonellae. J. med. Microbiol., 29: 81-88, 1989.
5. BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TURK, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. clin. Path., 45: 493-496, 1966.
6. BERCHIERI, A. JR.; IRINO, K.; NEME, S.N.; CALZADA, C.T.; FERNANDES, S.A. & PESSOA, G.V.A. - Contaminação por *Salmonella* em farinhas de origem animal, utilizadas no preparo de rações. Pesq. Vet. bras., 4: 83-86, 1984.
7. BERCHIERI, A. JR.; PAULILLO, A.C.; FERNANDES, S.A.; IRINO, K. & PESSOA, G.V.A. - Sensibilidade a antimicrobianos por *Salmonella* isolados de farinha de origem animal utilizadas no preparo de rações. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 16: 56-60, 1985.

8. BITTER, L.; WEIGMANN, F. & HABS, H. - Bestimmung der gebildeten saurremenge zur unterscheidung verwandter bakterien rhamnosereaktion zur differenzierung von paratyphus -B und breslaubactirie. Munch. med. Wschr. 73: 940, 1926.
9. BRUNNER, F.; MARGADANT, A.; PEDUZZI, R. & PIFFARETTI, J.C. - The plasmid pattern as an epidemiologic tool for *S. typhimurium* epidemics comparision with the lysotype. J. infect. Dis., 148: 7-11, 1983.
10. CAMPOS, L.C. & HOFFER, E. - Colicinogeny in *Salmonella* serovars isolated in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83: 189-192, 1989.
11. CALZADA, C.T.; NEME, S.N.; IRINO, K.; KANO, E.; DIAS, A.M.G.; FERNANDES, S.A.; VAZ, T.M.I. & PESSOA, G.V.A. - Sorotipos de *Salmonella* identificados no período 1977-1982, no Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 44: 1-18, 1984.
12. CHALKER, R.B. & BLASER, M.J. - A review of human salmonellosis: III- Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. Rev. infect. Dis., 10: 111-124, 1988.
13. CORDANO, A.M.; RICHARD, C. & VIEU, J.F. - Biotypes de *Salmonella typhimurium*. Enquete sur 513 souches isolees en France en 1969-1970. Ann. Inst. Pasteur, 121: 473-478, 1981.
14. DAVIS, B.D. & MINGIOLI, E.S. - Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. J. Bact., 60: 17, 1950.
15. DUGUID, J.P.; ANDERSON, E.S. & CAMPBELL, I. - Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae. J. Path. Bact., 92: 107-138, 1966.
16. DUGUID, J.P.; ANDERSON, E.S.; ALFREDSSON, G.A.; BARKER, R. & OLD, D.C. - A new biotyping scheme for *Salmonella typhimurium* and its phylogenetic significance. J. med. Microbiol., 8: 149-166, 1975.
17. EDWARDS, P.R. - Salmonellosis: observations on incidence and control. Ann. N. Y. Acad. Sci., 70: 598-613, 1958.
18. EJZENBERG, B.; BALDACK, E.R.; RODRIGUES, N.A.; PESSOA, G.V.A.; MELLE, C.E.A. & SIMONSEN, V. - Septicemia por *Salmonella typhimurium* - Sensibilidade antibiótica e correlação entre hemocultura e coprocultura. Pediatria (São Paulo), 4: 211-214, 1982.
19. ESPER, M.R.N.R.; PESSOA, G.V.A.; SPIR, M.; CALZADA, C.T.; AMANO, R.N. & FREITAS, A.M. - Infecção intra-hospitalar ocasionada por biossorotipo de *Salmonella typhimurium* lisina descarboxilase negativa em Presidente Prudente, Estado de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 40: 77-82, 1980.
20. FERNANDES, L.C. & AMARAL, S.L. - Gastrenterite hospitalar por *Salmonella agona*. Aspectos clínicos e hospitalares. J. bras. Med., 52: 38-44, 1987.
21. GUINEE, P.A.M.; KANPELMACHER, E.H. & WILLEMS, H.M.C.C. - Six new serotypes in Ghana (*S. volta*, *S. agona*, *S. wa*, *S. techimani*, *S. mampong* and *S. tafo*). Antonie v. Leeuwenhoek., 27: 469-472, 1961.
22. HOLMBERG, S.D.; WACHSMUTH, L.K.; BRENDER, F.W. & COHEN, M.L. - Comparasion of plasmid profile analysis, phage typing and antimicrobial susceptibility testing isolates from outbreak. J. clin. Microbiol., 19: 100-104, 1984.
23. KAPPERUD, G.; LASSEN, J.; DOMMARSNES, K.; KRISTIANSEN, B.E.; CAUGANT, D.A.; ASK, E. & JAHKOLA, M. - Comparasion of epidemiological marker methods for identification of *Salmonella typhimurium* isolates from an outbreak caused by contaminated chocolate. J. clin. Microbiol., 27: 2019-2024, 1989.
24. LE MINOR, L. & BEN HAMIDA, F. - Avantages de recherche de la beta-galactosidase sur celle de la fermentation du lactose en milieu complexe dans le diagnostic bacteriologique, en particulier des *Enterobacteriaceae*. Ann. Inst. Pasteur, 102: 267-277, 1962.
25. LE MINOR, L. & POPOFF, M.Y. - Formules antigeniques des serovars de *Salmonella*. CENTRE COLLABORATEUR OMS DE REFERENCE ET DE RECHERCHE POUR LES *SALMONELLA*/INSTITUT PASTEUR, Paris, 1987. 146p.
26. LE MINOR, L. - Typing of *Salmonella* species. Europ. J. clin. Microbiol. infect. Dis., 7: 214-218, 1988.
27. LINTON, A.H. ed. - Guidelines on prevention and control of salmonellosis. Geneve, WHO, (WHO/VPH/83.42), 1983. 128p.
28. PELUFFO, C.A.; BIER, O.; AMARAL, J.P. & BIOCCHA, E. - Estudos sobre as salmoneloses em São Paulo. I. Incidência dos diferentes tipos em diarreias infantis. Mem. Inst. Butantan, 19: 211, 1946.
29. PELUFFO, C.A.; IRINO, K. & MELLO, S. - Virulencia y multirresistencia a drogas de cepas epidemicas de *Salmonella typhimurium* aisladas en hospitales infantiles de Sudamerica. Mem. Inst. Butantan, 38: 1-12, 1974.
30. PESSOA, G.V.A. - Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora da lactose. Rev. Inst. Adolfo Lutz., 33: 13-28, 1973.
31. PESSOA, G.V.A.; IRINO, K.; CALZADA, C.T.; MELLE, C.E.A. & KANO, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo, no septênio 1970-1976. I- Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38: 87-105, 1978.
32. PESSOA, G.V.A.; IRINO, K.; MELLE, C.E.A.; CALZADA, C.T.; RASKIN, M. & KANO, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-1976. II- O surto epidêmico de *Salmonella typhimurium* em São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38: 107-127, 1978.

33. PESSOA, G.V.A.; SUGUIMORI, R.T.; IRINO, K.; RASKIN, M. & CALZADA, C.T. - Isolamento de enterobactérias patogênicas em berçários em município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40: 107-127, 1980.
34. PESSOA, G.V.A.; CALZADA, C.T.; IRINO, K.; NEME, S.M.; KANO, E.; DIAS, A.M.G. & BRANDILEONE, M.C.C. - *Salmonella typhimurium*, fermentadora tardia da lactose. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 43: 89-95, 1983.
35. PLATT, D.J.; BROWN, D.J.; OLD, D.C.; BARKER, R.M.; MUNRO, D.S. & TAYLOR, J. - Old and new techniques toge ther resolve a problem of infection by *Salmonella typhimurium*. *Epidem. Infect.*, 99: 137-142, 1987.
36. REILLEY, W.J.; OLD, D.C.; MUNRO, D.S. & SHARP, J.C.M. - An Epidemiological study of *Salmonella montevideo* by biotyping. *J. Hyg. (Lond.)*, 95: 23-28, 1985.
37. SOLARI, C.A.; REIS, E.N. & HOFFER, E. - Biotipos antimicrobianos e tipos de colicinas: potenciais marcadores epidemiológicos de *Salmonella agona*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 79: 471-478, 1984.
38. SOLARI, C.A.; REIS, E.M.; DIAS, J.C. & HOFFER, E. - Resistência antimicrobiana de *Salmonella agona* oriundas de várias regiões do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 81: 7-14, 1986.
39. STERN, W. - Studien zur differenzierung der bakterien der coli-typhus - gruppe mittels gefarbter, flussiger nahrboden. Beitrage zur biologie der bakteriengruppe paratyphus B-enteritis. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, 78: 481, 1916.
40. TACKET, C.O. - Molecular epidemiology of *Salmonella*. *Epidem. Rev.*, 11: 99-108, 1989.
41. TAUNAY, A.E.; CORREA, G.A. & FLEURY, C.T. - Frequência de alguns agentes microbianos nas chamadas diarreias infantis em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 5: 331-336, 1945.
42. TAUNAY, A.E. - Diagnóstico bacteriológico das salmoneloses de origem animal, sua importância e frequência no município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28: 43-69, 1968.
43. TAUNAY, A.E.; NOVAES, J.R.C. & PESSOA, G.V.A. - Infecções por enterobactérias no município de São Paulo. Provável disseminação por via aérea. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31: 113-116, 1971.
44. TAKAHASHI, S. & YUKI, N. - Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. *J. clin. Microbiol.*, 20: 608-619, 1984.
45. VICENTE, A.C. & ALMEIDA, D.F. - Identification of multiple resistance (R) and colicinogly (col) plasmid in an epidemic *Salmonella agona* serotype in Rio de Janeiro. *J. Hyg. (Lond.)*, 93: 79-84, 1984.
46. WORLD HEALTH ORGANIZATION - Report of the WHO/WAVFH round table conference on the present status of the *Salmonella* problem (prevention and control). Bilthoven, The Netherlands, 6-10 october, 1980.
47. WHO EXPERT COMMITTEE ON SALMONELLOSIS CONTROL - Geneva, 1987. Salmonellosis control: the role of animal and product hygiene. Report Geneva, WHO, 1988. 83p. (*Wld. Hlth. Org. techn. Rep. Ser.*, (774), 1988).

Recebido para publicação em 21/5/1991.
Aceito para publicação em 12/3/1992.