

Alex Domingos Reis

**Caracterização molecular dos mecanismos de  
resistência, perfil de virulência e diversidade genética  
de cepas de *Salmonella* Heidelberg**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Coordenadoria de  
Controle de Doenças da Secretaria  
de Estado da Saúde de São Paulo,  
para obtenção do Título de Mestre  
em Ciências.

**Área de Concentração:** Vigilância  
em Saúde Pública

**Orientador:** Profa. Dra. Monique  
Ribeiro Tiba Casas

**SÃO PAULO**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Reis, Alex Domingos

Caracterização molecular dos mecanismos de resistência, perfil de virulência e diversidade genética de cepas de *Salmonella* Heidelberg/Alex Domingos Reis. - 2022.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2022.

Área de concentração: Vigilância em Saúde Pública

Orientação: Profa. Dra. Monique Ribeiro Tiba Casas

1. *Salmonella*/classificação. 2. Sequenciamento completo do genome/métodos. 3. Filogenia/análise filogenética. 4. *Salmonella* Heidelberg/classificação.

SES/CCD/CD - 454/2022

## **Dedicatória**

**A minha mãe, meu pai e marido que sempre estiveram ao meu lado.**

## **Agradecimentos**

Aos meus amados pais, Cristina e Jacques, por sempre terem acreditado no meu potencial, por terem me apoiado incondicionalmente em todos os momentos; eles são exemplos de amor verdadeiro e sempre vão me inspirar a ter perseverança na minha vida pessoal e profissional. Ao meu marido Lucas, que sem dúvida está ao meu lado todos os dias, apoiando-me e me confortando, tornando os meus dias especiais. Eu sempre vou amar vocês.

Aos meus grandes amigos e colegas Marlon, Ariadne, Amanda Y., Karoline, Ivan, Carolina, Amanda B., Carla, Erica e Sandra, que de certa forma estavam inseridos no meu dia-dia de trabalho e que, sem dúvida, fizeram parte dessa caminhada, sendo importante para meu crescimento profissional e deste projeto.

À minha orientadora Profa. Dra. Monique Ribeiro Tiba Casas, por me acolher como aluno e se prontificar a passar seu conhecimento. Obrigado por confiar a mim essa tarefa de ser seu orientando, você sempre será lembrada por mim com muito carinho e apreço.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por me conceder a bolsa de estudos parcial e me permitir a realização da tão desejada ascensão profissional.

Aos ilustres pesquisadores Dr. Claudio Tavares Sacchi, Dr. Carlos Henrique Camargo e Dra. Ana Paula Silva de Lemos, por compartilhar seus conhecimentos e experiências comigo. Às chefias e aos colegas do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, muito obrigado a todos, que de maneira direta ou indireta me auxiliaram nesse trabalho.

Esse trabalho teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), número do processo: 88887.496870/2020-0.

## **Epígrafe**

**“Quem, de três milênios, não é capaz de se dar conta, vive na ignorância, na sombra, à mercê dos dias, do tempo.”**

**(Johann Goethe)**

## Resumo

### REIS, A. D. Caracterização molecular dos mecanismos de resistência, perfil de virulência e diversidade genética de cepas de *Salmonella* Heidelberg.

*Salmonella* spp. são os mais frequentes agentes causadores de surtos de origem alimentar sendo tipicamente encontrado em aves, e o sorotipo Heidelberg ganhou destaque entre esses isolados. Nos últimos anos, o aumento da resistência antimicrobiana verificada em *Salmonella*, principalmente no sorotipo Heidelberg tem sido de grande interesse em saúde pública em nível Nacional. Diante desta prioridade, o presente estudo teve como objetivo caracterizar a diversidade genética, verificar a presença de fatores de virulência e os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência aos antimicrobianos em 32 isolados de *S. Heidelberg*. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado pela técnica de disco-difusão. Os isolados foram geneticamente comparados pela técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE). A técnica do sequenciamento do genoma completo (WGS) permitiu a pesquisa dos fatores de virulência, dos genes adquiridos e mutações pontuais presentes em genes cromossomais associados a mecanismos de resistência. Além disso, os isolados também foram caracterizados pelas técnicas de *Multi-Locus Sequence Typing* (MLST), análise de *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs) e *core genome MLST* (cgMLST). Vinte e seis isolados (81,3%) apresentaram resistência a três ou mais diferentes classes de antimicrobianos. A técnica de PFGE demonstrou 80,4% de similaridade entre os isolados, e os agrupou em 21 diferentes pulso-tipos. A pesquisa de genes de virulência resultou na presença de vários fatores em todos os isolados entre eles: Lpf, MisL, RatB, MgtBC, *sifA*, *ssaR*, *invA*, *sopB* e *fljB*. Foram detectados genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos *bla*<sub>CMY-2</sub> (n=20/62,5%) e *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (n=2/6,3%), a aminoglicosídeos *aac*(3)-*Via* (n=3/9,4%), *aac*(6')-*Iaa* (n=32/100%) e *aadA1* (n=4/ 12,5%), a tetraciclinas *tet*(A) (n=25/78,1%) e a sulfonamidas *sul2* (n=25/78,1%). Entre os isolados que apresentaram mutações pontuais, 26 (81,3%) apresentaram em *gyrA* (p.S83F) e 30 isolados (93,8%) em *parC* (p.T57S). A caracterização *in silico* dos plasmídeos demonstrou a presença de Col(pHAD28) (n=11/34,4%), ColpVC (n=25/78,1%), IncX1 (n=26/81,3%), IncC (n=24/75%) e IncI1 (n=18/56,3%). Todas as linhagens estudadas foram verificadas como pertencendo ao ST15 pelo MLST. A análise de SNPs revelou que os isolados são altamente conservados entre si e gerou uma árvore filogenética com quatro agrupamentos, enquanto que a análise de cgMLST confirmou esses resultados e identificou um isolado de origem animal como ancestral em comum. Os resultados reforçam a necessidade de intensificar a vigilância contínua para detecção precoce e contenção destes determinantes de resistência, uma vez que este sorotipo está presente na cadeia alimentar, indicando uma potencial cadeia de transmissão entre humanos, animais e reservatórios ambientais.

**Palavras-chave:** *Salmonella enterica*, Sequenciamento Completo do Genoma, Filogenia, *Salmonella* Heidelberg

## Abstract

### REIS, A. D. Molecular characterization of resistance mechanisms, virulence profile and genetic diversity of *Salmonella* Heidelberg strains.

*Salmonella* spp. are the most frequent causative agents of foodborne outbreaks, typically found in poultry, and the Heidelberg serotype has gained prominence among isolated poultry samples. In recent years, the increase in antimicrobial resistance verified in *Salmonella*, mainly in the Heidelberg serotype, has been of great interest in public health at the national level. Given this priority, the present study aimed to characterize the genetic diversity and verify the presence of virulence factors and the phenotypic and genotypic profiles of antimicrobial resistance in 32 isolates of *S. Heidelberg*. The disk-diffusion technique determined antimicrobial susceptibility testing. Isolates were molecularly typed by the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) technique. The whole-genome sequencing (WGS) technique allowed the investigation of virulence factors, acquired genes, and point mutations present in chromosomal genes associated with resistance mechanisms. In addition, the isolates were also characterized by the Multi-Locus Sequence Typing (MLST) technique, the single-nucleotide polymorphisms (SNPs), and the core genome MLST (cgMLST) analysis. Twenty-six isolates (81.3%) were resistant to three or more different classes of antimicrobials. PFGE showed 80.4% similarity between the isolates and grouped them into 21 different pulse types. The search for virulence genes verified the presence of several virulence factors in all isolates, including Lpf, MisL, RatB, MgtBC, *sifA*, *ssaR*, *invA*, *sopB*, and *fljB*.  $\beta$ -lactam resistance genes *bla*<sub>CMY-2</sub> (n=20/62,5%), *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (n=2/6,3%). Aminoglycoside resistance genes *aac(3)-Via* (n=3/9,4%), *aac(6')-Iaa* (n=32/100%), *aadA1* (n=4/ 12,5%) and *tet(A)* (n=25/78,1%), *sul2* (n=25/78,1%) were detected. Among the isolates that showed point mutations, 26 isolates (81.3%) presented in *gyrA* (p.S83F) and 30 isolates (93,8%) in *parC* (p.T57S). The *in silico* characterization of the plasmids demonstrated the presence of plasmids Col(pHAD28) (n=11/34.4%), ColpVC (n=25/78.1%), IncX1 (n=26/81.3%), IncC (n=24/75%) and IncI1 (n=18/56.3%). All studied strains were verified as belonging to ST15 by the MLST. The SNPs analysis verified that the isolates are highly conserved and generated a phylogenetic tree with four clusters, whereas cgMLST demonstrated the isolates' high conservation by identifying an isolate of animal origin as a common ancestor. The results reinforce the need to intensify continuous surveillance for early detection and containment of these resistance determinants since this serotype is present in the food chain, indicating a potential chain of transmission between humans, animals, and environmental reservoirs.

**Keywords:** *Salmonella enterica*, Whole Genome Sequencing, Phylogeny, *Salmonella* Heidelberg

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AGF	<i>aggregative fimbriae</i>
AK	Amicacina
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
AmpC	$\beta$ -lactamase do tipo AmpC
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
<i>bla</i>	Gene codificador de $\beta$ -lactamases
BLDB	<i>Beta lactamase database</i>
BLs	$\beta$ -lactamases
BLT	<i>Bead-linked transposomes</i>
bp ou pb	Pares de bases
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CGE	<i>Center for Genomic Epidemiology</i>
cgMLST	<i>Core genome multilocus sequence typing</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLB	Tampão de lise celular
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CN	Gentamicina
CRO	Ceftriaxona
CSB	Tampão de suspensão celular
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade ótica
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPS	Substância polimérica extracelular



ESBL	β-lactamase de espectro estendido
EUA	Estados Unidos da América
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FEP	Cefepime
FIM-1	Fímbrias do tipo I
FOX	Cefoxitina
H <sub>2</sub> S	Sulfeto de hidrogênio
I	Intermediário
IAL	Instituto Adolfo Lutz
ICEs	Elementos conjugativos integrativos
Inc	Incompatibilidade
IPM	Imipenem
LB	Caldo Luria-Bertani
LPF	<i>long polar fimbriae</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MDR	Multirresistente
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NA	Ácido nalidíxico
NaCl	Cloreto de sódio
NARMS	<i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	Não detectada
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMSA	Organização Mundial de Saúde Animal
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEF	Pefloxacino
PEFs	<i>plasmid encoded fimbriae</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
pMLST	<i>Plasmid multilocus sequence typing</i>
PMQR	<i>Plasmid-mediated quinolone resistance</i>
QRDR	Região Determinante de Resistência à Quinolona

R	Resistente
rpm	Rotação por minuto
S	Estreptomicina
S3	Sulfonamida
SE	Sensível
SILTs	<i>solitary intestinal lymphoid tissues</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SPIs	Ilhas de patogenicidade de <i>Salmonella</i>
STs	<i>Sequence type</i>
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprima
TBE	Tris-Borato EDTA
TCSs	<i>Two-Component Systems</i>
TE	Tetraciclina
TEA	Tris-EDTA
THG	Transferência horizontal de genes
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>
TSB	Caldo triptona de soja
TTSS	Sistemas de secreção do tipo III
UPGMA	<i>Unweighted pair group method using arithmetic averages</i>
wgMLST	<i>Whole genome multilocus sequence typing</i>
WGS	<i>Whole-genome sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## Lista de Figuras

- Figura 1 - Gel de agarose 1%, representativo do ensaio de PFGE das cepas de *Salmonella* Heidelberg, clivadas com a enzima *Xba*I.....66
- Figura 2 - Dendrograma obtido pela análise dos perfis de PFGE após digestão com *Xba*I das cepas de *Salmonella* Heidelberg. Foi utilizado o coeficiente de Dice com tolerância e otimização de 1,5% e UPGMA (Bionumerics 7.8). Estão indicados: sítio de origem, número da amostra\_ano, genes de resistência e o perfil de resistência fenotípica para as 32 cepas estudadas<sup>1</sup>.....67
- Figura 3 - E-gel® 2% agarose GP (Invitrogen™) representando o produto da extração do DNA genômico de algumas cepas de *S. Heidelberg* estudadas.....68
- Figura 4 - Perfil esquemático construído utilizando a aplicação web *Microreact* indicando em vermelho os respectivos plasmídeos detectados, em preto o gene *bla*<sub>CMY-2</sub>. Origem e procedência indicadas de acordo com a legenda, para as 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudados.....75
- Figura 5 - Árvore filogenética construída com base em *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) de alta qualidade (CSI Phylogeny) de 32 isolados de *Salmonella* Heidelberg estudados, construída com a aplicação web *Microreact*. Os círculos coloridos representam a origem dos isolados com base na legenda. Os resultados demonstrados no dendrograma são: sítio de origem, procedência e genes de resistência detectados<sup>2</sup>.....77
- Figura 6 - Árvore de extensão mínima de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, mostrando seu sítio de origem.....78

Figura 7 - Dendrograma de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, classificadas com base nos genes de resistência: *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *qnrB19* e não detectada (ND). A diferença no número de alelos está demonstrada nos ramos.....79

Figura 8 - Árvore de extensão mínima de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, em comparação com as cepas coletadas do banco de dados Enterobase mostrando seu sítio de origem e identificação dos isolados selecionados. As cepas do nosso trabalho estão destacadas com um quadro preto para melhor visualização.....80

Figura 9 - Árvore de extensão mínima de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, em comparação com as cepas coletadas do banco de dados Enterobase mostrando seu sítio de origem e identificação dos isolados selecionados e o número de diferença de alelos demonstrado entre os nós.....81

Figura 10 - Árvore de extensão mínima de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, em comparação com as cepas coletadas do banco de dados Enterobase mostrando o perfil de resistência genotípico a  $\beta$ -lactâmicos dos isolados com os genes *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, e *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.....82

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Distribuição geográfica por cidade dos 32 isolados estudados de *Salmonella* Heidelberg.....44

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classes e antimicrobianos pesquisados no estudo.....	38
Tabela 2 - Relação dos isolados de <i>Salmonella</i> Heidelberg de acordo com sítio de isolamento e hospedeiro.....	45
Tabela 3 - Número e porcentagem de isolados resistentes e que apresentaram perfis intermediário de resistência entre os 32 isolados estudados de <i>Salmonella</i> Heidelberg.....	64
Tabela 4 - Perfil genotípico de virulência dos 32 isolados estudados de <i>S. Heidelberg</i> .....	69
Tabela 5 - Número e porcentagem de isolados que apresentaram genes de resistência a antimicrobianos ou mutação em genes cromossômicos.....	72
Tabela 6 - Substituições de aminoácidos em <i>gyrA</i> e <i>parC</i> das 30 cepas que foram detectadas mutações de <i>S. Heidelberg</i> .....	73
Tabela 7 - Número e porcentagem de isolados que apresentaram plasmídeos e seus respectivos <i>Sequence Types</i> .....	74

## Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	<i>Salmonella</i> spp.....	15
1.2	epidemiologia do sorotipo Heidelberg .....	18
1.3	Fatores de virulência .....	20
<b>1.3.1</b>	<b>Interação da <i>Salmonella</i> com as defesas entéricas do hospedeiro</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3.2</b>	<b>Mecanismos de adesão e invasão</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3.3</b>	<b>Ilhas de patogenicidade</b> .....	<b>24</b>
<b>1.3.4</b>	<b>Mecanismos de resposta inflamatória</b> .....	<b>27</b>
<b>1.3.5</b>	<b>Sobrevivência dentro dos fagócitos</b> .....	<b>28</b>
1.4	Resistência aos antimicrobianos .....	29
<b>1.4.1</b>	<b>Conceito</b> .....	<b>29</b>
<b>1.4.2</b>	<b>Tratamento com antimicrobiano</b> .....	<b>30</b>
<b>1.4.3</b>	<b>Mecanismos de resistência</b> .....	<b>31</b>
1.5	Metodologias de tipagem bacteriana.....	38
<b>1.5.1</b>	<b>Análise de <i>single-nucleotide polymorphisms</i> (SNPs)</b> .....	<b>40</b>
<b>1.5.2</b>	<b><i>Multilocus sequence typing</i> (MLST)</b> .....	<b>41</b>
<b>1.5.3</b>	<b><i>Core genome</i> MLST (cgMLST)</b> .....	<b>42</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>43</b>
2.1	Objetivos específicos.....	43
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
3.1	Isolados bacterianos.....	44
3.2	Caracterização fenotípica dos isolados de <i>S. Heidelberg</i> .....	46
<b>3.2.1</b>	<b>Testes de sensibilidade antimicrobiana</b> .....	<b>46</b>
3.2.1.1	Ativação das cepas .....	46
3.2.1.2	Método de difusão em disco.....	46
3.2.1.3	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por teste epsilométrico (E-test) .....	47
3.3	Caracterização genotípica dos isolados de <i>Salmonella</i> .....	48

<b>3.3.1</b>	<b>Extração de DNA para sequenciamento de genoma completo e verificação da pureza e integridade do DNA genômico.....</b>	<b>48</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Eletroforese em gel campo pulsado (PFGE).....</b>	<b>49</b>
3.3.2.1	Preparo das Amostras.....	50
3.3.2.2	Crescimento bacteriano e lise celular.....	50
3.3.2.3	Digestão do DNA.....	51
3.3.2.4	Gel de eletroforese em campo pulsado.....	51
3.3.2.5	Análise do Perfil Genético .....	52
<b>3.3.3</b>	<b>Sequenciamento do genoma completo.....</b>	<b>52</b>
3.3.3.1	Diluição do DNA .....	53
3.3.3.2	Fragmentação do DNA.....	53
3.3.3.3	Lavagem pós-marcação .....	54
3.3.3.4	Amplificação do DNA marcado.....	54
3.3.3.5	Purificação das bibliotecas .....	55
3.3.3.6	Quantificação e normalização das bibliotecas.....	56
3.3.3.7	Mistura das bibliotecas, normalização e carregamento.....	56
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISES GENÔMICAS PELO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO.....</b>	<b>58</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Análise dos dados obtidos através do WGS.....</b>	<b>58</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Pesquisa de genes de virulência .....</b>	<b>58</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos.....</b>	<b>60</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Detecção e tipagem <i>in silico</i> de plasmídeos.....</b>	<b>61</b>
3.5	Análises Filogenéticas.....	62
<b>3.5.1</b>	<b><i>Multilocus sequence typing</i> (MLST) .....</b>	<b>62</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Análise de <i>single-nucleotide polymorphism</i> (SNP).....</b>	<b>62</b>
<b>3.5.3</b>	<b><i>Core genome</i> MLST (cgMLST).....</b>	<b>63</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>64</b>
4.1	Testes de susceptibilidade antimicrobiana .....	64
4.2	Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE).....	65
4.3	Extração e verificação da pureza e integridade do DNA genômico.	67
4.4	Pesquisa de fatores de virulência.....	68
4.5	Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos .....	70

4.6	Detecção e tipagem <i>in silico</i> de plasmídeos.....	74
4.7	<i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	76
4.8	Análise de <i>single-nucleotide polymorphisms</i> (SNPs) .....	76
4.9	<i>core genome</i> MLST (cgMLST) .....	77
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>83</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>98</b>
<b>Anexo 1</b>	Preparo de Soluções	
<b>Anexo 2</b>	Perfil fenotípico e genotípico de resistência a antimicrobianos dos 32 isolados estudados de <i>S. Heidelberg</i>	
<b>Anexo 3</b>	Metadados e perfil genotípico de resistência a $\beta$ -lactâmicos dos isolados selecionados do <i>Enterobase</i>	



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Salmonella* spp.

Membros do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae* (BRENNER; FARMER, 2005; EWING; EDWARDS, 1986). As espécies deste gênero são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, e móveis. O gênero *Salmonella* é tipicamente definido por sua capacidade de usar citrato como única fonte de carbono, lisina como fonte de nitrogênio e pela produção de H<sub>2</sub>S, exceções a essas características são usadas para definir espécies, subespécies e alguns sorotipos (EWING; EDWARDS, 1986; POPOFF; LE MINOR, 2005).

O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (TINDALL et al., 2005). *S. enterica* é subdividida em seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, frequentemente chamada de subespécie I; *S. enterica* subsp. *salamae*, ou subespécie II; *S. enterica* subsp. *arizonae* ou subespécie IIIa; *S. enterica* subsp. *diarizonae* ou subespécie IIIb; *S. enterica* subsp. *houtenae* ou subespécie IV; e *S. enterica* subsp. *indica* ou subespécie VI (ROHDE, 1979).

As cepas da subespécie I são comumente isoladas de humanos e animais de sangue quente. As cepas das subespécies II, IIIa, IIIb, IV e VI e *S. bongori* são geralmente isoladas de animais de sangue frio e do ambiente. As cepas não subespécies I são normalmente consideradas patógenos humanos raros, eles constituem cerca de 1 a 2% dos isolados de *Salmonella* relatados ao Sistema Nacional de Vigilância de *Salmonella* dos Estados Unidos (<http://www.cdc.gov/national-surveillance/salmonella-surveillance.html>).

A sorotipagem de *Salmonella* é um método de subtipagem baseado na caracterização imunológica de três estruturas de superfície: antígeno O, que é a porção mais externa da camada de lipopolissacarídeo (LPS) que

cobre a célula bacteriana; o antígeno H, que é a porção do filamento do flagelo bacteriano; e o antígeno Vi, que é um polissacarídeo capsular presente em sorotipos específicos. A sorotipagem de *Salmonella* é comumente realizada para nortear ações de prevenção a vigilância em saúde pública para infecções por *Salmonella* e para auxiliar no reconhecimento de surtos. O nome do sorotipo é identificado com a primeira letra maiúscula e sem itálico, para se diferenciar da espécie. Embora os métodos moleculares como o sequenciamento de genoma completo (*Whole Genome Sequencing* - WGS) e Eletroforese em Gel de Campo Pulsado ou *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) tenham se tornado a base da subtipagem de saúde pública, a sorotipagem continua sendo uma ferramenta importante (GERNER-SMIDT et al., 2006; NADON et al., 2013; REBOLLEDO et al., 2014).

O sorotipo de um isolado frequentemente se correlaciona com uma síndrome de doença particular ou veículo alimentar, tornando os dados do sorotipo particularmente úteis na identificação de casos e definição de surtos. Por exemplo, *S. Typhi* causa febre tifoide, uma síndrome de doença mais grave do que as causadas pela maioria dos outros sorotipos de *Salmonella*, já o sorotipo Enteritidis está frequentemente associado a infecções adquiridas de produtos de origem aviária (frango e ovo) (ALLARD et al., 2013).

*Salmonella* spp. são categorizadas também como tifóide e não tifóide, correspondendo à síndrome da doença à qual estão associadas. A febre tifóide, causada pelo sorotipo Typhi, é uma condição médica grave de distribuição mundial associada a baixos níveis socioeconômicos, situação precária de saneamento básico, higiene pessoal e ambiental. Aproximadamente 200 a 300 casos de *S. Typhi* são relatados nos Estados Unidos (EUA) a cada ano (IMANISHI et al., 2015; LYNCH et al., 2009). Cerca de 80% desses casos ocorrem entre viajantes para países onde a febre entérica é endêmica, particularmente países do Centro-Sul da Ásia (IMANISHI et al., 2015; LYNCH et al., 2009). No Brasil ocorre de forma

endêmica em algumas regiões brasileiras, principalmente nas regiões Norte e Nordeste e está associada à baixa cobertura sanitária (BRITO et al., 2020).

Os sintomas da febre tifóide são febre alta debilitante e contínua, vômitos, dor abdominal, cefaleia, podendo apresentar ainda em casos de complicação, perfuração intestinal e esplenomegalia (BRITO et al., 2020; SCALLAN et al., 2011). Os adultos se apresentam caracteristicamente sem diarreia. A doença é mais branda em crianças com menos de 5 anos, onde pode se manifestar como febre inespecífica. Os humanos são o único reservatório para *S. Typhi*, que geralmente possui uma dose infecciosa baixa (<10<sup>3</sup> organismos) e um período de incubação longo e altamente variável (1 a 6 semanas). É transmitido por contato pessoa a pessoa ou alimentos e água contaminados com fezes (SCALLAN et al., 2011).

*Salmonella* não tifóide geralmente causa infecções intestinais (acompanhadas por diarreia, febre e cólicas abdominais) que geralmente duram uma semana ou mais (ACHESON; HOHMANN, 2001). Ela também pode causar infecções extra-intestinais (por exemplo, infecção de corrente sanguínea, infecção do trato urinário ou osteomielite), especialmente em pessoas imunocomprometidas. Pessoas de todas as idades podem ser afetadas, mas a incidência é alta em crianças ≤ 5 anos (SCALLAN et al., 2011).

*Salmonella* é frequentemente isolada do intestino de humanos e animais. Alguns sorotipos são isolados apenas em humanos como *S. Typhi*, enquanto outros sorotipos como Gallinarum, Dublin e Choleraesuis estão associados a certos hospedeiros animais como aves, bovinos e suínos respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Membros desse gênero podem ser isolados de alimentos como carnes e aves ou água contaminada, mas também são associados a outros veículos alimentares, como produtos frescos e industrializados (CAVALLARO et al., 2011; HANNING; NUTT; RICKE, 2009).

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA DO SOROTIPO HEIDELBERG

Surtos de infecção por *S. Heidelberg* vem sendo relatado ao longo dos anos. Recentemente um surto foi vinculado ao consumo de frango separado mecanicamente no Tennessee, EUA. Dos nove isolados humanos testados, dois (22%) eram multirresistentes (definido como resistente a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais classes de antimicrobianos) (CDC, 2014) e sete (78%) eram pan-sensível (sensíveis a todos os antimicrobianos testados). Ambos os isolados multirresistentes coletados de pessoas doentes mostraram resistência à ceftriaxona, um antimicrobiano comumente usado para tratar infecções sérias de *Salmonella*. Esses dois isolados também mostraram resistência a combinações dos seguintes antimicrobianos adicionais: ampicilina, cefoxitina, ceftiofur, amoxicilina-ácido clavulânico, sulfisoxazol, tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima. A resistência a alguns desses antimicrobianos pode estar associada a um risco aumentado de hospitalização ou ao desenvolvimento de uma infecção da corrente sanguínea (CDC, 2014).

Outro caso de surto recente atingiu 15 estados americanos por infecções de *S. Heidelberg* multirresistente, devido ao contato com bezerros leiteiros. Um total de 56 pessoas foram infectadas, 35% das pessoas foram hospitalizadas e nenhuma morte foi relatada. A análise de WGS identificou resistência antimicrobiana a amoxicilina-ácido clavulânico, ampicilina, cefoxitina, ceftriaxona, estreptomicina e tetraciclina. Além disso, verificou-se sensibilidade reduzida à ciprofloxacina. Todos os dez isolados testados foram sensíveis à azitromicina e meropenem (CDC, 2018).

O Brasil é um dos países em destaque no mercado avícola internacional, uma vez que é o maior exportador e o segundo maior produtor de carne de frango (EMBRAPA, 2021). Com a expansão da avicultura, aumenta o risco de disseminação de doenças, especialmente aquelas que podem ser transmitidas ao homem através do consumo de produtos de origem animal. A *Salmonella* spp. é um dos principais agentes causadores

de doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, inclusive no Brasil. Apesar da *Salmonella* ser parte da microbiota de frangos, muitas vezes sem manifestações clínicas, ela sempre deverá ser tratada como um patógeno para esse animal, uma vez em que se pode estabelecer a difícil relação de se eliminar do intestino desses animais. Sendo assim deve-se considerar sempre a *Salmonella* como patogênica, pois mesmo que não cause diretamente a morte do frango, ela pode ocasionar quadros de disbiose e possíveis complicações por outros patógenos. Sua ocorrência nos mesmos varia conforme o manejo e a tecnologia de abate, podendo representar um risco ao consumidor e uma grande barreira a exportações, uma vez que alguns sorotipos são mais ou menos patogênicos. *S. Heidelberg* se destacou inicialmente no cenário nacional como um dos principais sorotipos isolados a partir de fontes avícolas, na região sul do Brasil, porém hoje está distribuído em quase todo o país (ALMEIDA, 2018).

No trabalho de FERNANDES et al., 2022 foram avaliados 9.014 isolados de *Salmonella* de origem humana e não humana, recebidos de 2004 a 2020 para sorotipagem no Instituto Adolfo Lutz, laboratório de referência em saúde pública no Brasil. Um total de 156 sorotipos diferentes foram identificados entre os 5.461 isolados de *Salmonella* de origem não humana. Apesar da alta diversidade de sorotipos detectados, a maioria dos isolados limitou-se a poucos sorotipos. Os 10 sorotipos de *Salmonella* mais prevalentes foram Enteritidis, Mbandaka, Typhimurium, Agona, Anatum, Senftenberg, Heidelberg, S. I. 4,[5],12:i:-, Infantis e Saintpaul, os quais representaram 47,5% (2.592) do total de isolados recuperados de alimentos, animais e meio ambiente. Quatro por cento (193) do total de isolados foram identificados como *S. Heidelberg*, sendo este o sorotipo com maior aumento na frequência entre as fontes não humanas, principalmente associados a amostras de aves.

### 1.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

*Salmonella* possui várias estratégias de virulência para escapar da resposta imune do hospedeiro. A presença de genes de virulência nas cepas é indicativa do potencial patogênico dos isolados e estes fatores são reconhecidos por propiciar ao micro-organismo a invasão e colonização das células do hospedeiro, determinando uma série de eventos que levam o desencadeamento da doença (VIEIRA, 2009). A maioria dos genes de virulência está localizada em regiões consideradas conservadas, denominadas de ilhas de patogenicidade de *Salmonella* (SPIs), sendo que estes genes são responsáveis por codificar importantes fatores de virulência. Além das ilhas de patogenicidade, outros genes também podem ser encontrados em plasmídeos e até mesmo no cromossomo (FÀBREGA; VILA, 2013). Vários fatores relacionados ao patógeno e ao hospedeiro influenciam a patogênese da gastroenterite por *Salmonella*.

#### 1.3.1 Interação da *Salmonella* com as defesas entéricas do hospedeiro

Os micro-organismos ingeridos devem atravessar a barreira ácida do estômago para estabelecer a infecção entérica. Embora a *Salmonella* e outros patógenos entéricos sobrevivam mal no pH muito baixo encontrado no estômago, a *Salmonella* exibe maior tolerância ao "choque ácido" se exposta pela primeira vez a um ambiente moderadamente ácido (pH 4 a 5). A capacidade do organismo de se adaptar ao baixo pH tem sido chamada de resposta de tolerância ácida (FOSTER, 1995).

As salmonelas que sobrevivem à passagem pelo estômago devem então competir com a flora microbiana intestinal nativa. A flora nativa é uma barreira importante, mas muitas vezes negligenciada, à infecção por patógenos entéricos. Estudos em camundongos realizados na década de

1960 mostraram que uma única injeção de estreptomicina reduziu a dose infecciosa oral de *S. Typhimurium* em mais de 100.000 vezes (BOHNHOFF; MILLER; MARTIN, 1964). Estudos em animais mostraram que o efeito protetor de micróbios da microbiota é devido a uma variedade de fatores, incluindo competição por nutrientes, manutenção de um pH luminal baixo e produção de compostos inibitórios, como ácidos graxos voláteis (QUE; CASEY; HENTGES, 1986; TANNOCK; SAVAGE, 1976).

Essas descobertas parecem ser aplicáveis aos seres humanos, como pode ser observado pelas seguintes observações: a terapia antimicrobiana profilática aumenta a frequência de salmonelose entre os viajantes (MENTZING; RINGERTZ, 2009); os pacientes infectados durante um surto de enterite multirresistente por *S. Typhimurium* usaram antimicrobianos no mês anterior ao início da doença com muito mais frequência do que os controles (30% versus 6%) (RYAN et al., 1987); uma associação semelhante com o uso prévio de antimicrobianos foi observada em um surto multiestatal de doença causado por *Salmonella* Havana que era pansensível a agentes antimicrobianos (30% versus 13%) (PAVIA et al., 1990).

Além da competição da flora bacteriana nativa, a *Salmonella* deve resistir a uma gama de defesas entéricas, incluindo sais biliares, enzimas pancreáticas, peptídeos antimicrobianos das células de Paneth e IgA secretora (MICHETTI et al., 1992; SELSTED et al., 1992).

### **1.3.2 Mecanismos de adesão e invasão**

Existem dois componentes principais na infecção por *Salmonella* do trato gastro intestinal: adesão e invasão subsequente. A adesão é complexa e é mediada por múltiplos genes. As fímbrias são muito importantes na adesão e adaptação à superfície de uma célula eucariótica (LEDEBOER et al., 2006); vários *operons* fimbriais podem facilitar a adesão (WEENING et al., 2005). Existem diferentes tipos de fímbrias, dentre elas, as fímbrias do

tipo I (Fim-1), fímbrias codificadas por plasmídeos ou *Plasmid Encoded Fimbriae* (Pef), fímbria polar longa ou *long polar fimbriae* (Lpf) e fímbrias agregativas ou *aggregative fimbriae* (Agf), sendo que cada uma destas possui tropismo por diferentes tipos de células em diferentes hospedeiros (DARWIN; MILLER, 1999).

A Lpf é considerada a maior das fímbrias descritas, está localizada polarmente na célula bacteriana, e é codificada pelo *operon lpfABCDE* e foi identificado pela primeira vez em *S. Typhimurium*, sendo exclusivamente identificado no gênero *Salmonella*, e ausente nas demais enterobactérias. Este *operon* está relacionado com a capacidade de adesão da *Salmonella* às células M presentes na placa de Peyer do íleo no intestino (BÄUMLER et al., 1997; BÄUMLER; HEFFRON, 1995; NORRIS; BAUMLER, 1999).

Os biofilmes também podem desempenhar um papel importante (LEDEBOER et al., 2006). O gene *agfA* (atual *csgA*) é responsável por codificar a subunidade AgfA da fímbria agregativa, cuja função principal é promover a interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro e adesão bacteriana a várias superfícies inertes, incluindo aquelas usadas na produção de alimentos. As Agf são essenciais para a síntese de polímeros naturais de alto peso molecular secretados pela bactéria em seu ambiente denominados como substância polimérica extracelular (EPS), envolvido na formação de biofilme e persistência ambiental. Por esse motivo, também é considerado um gene importante para a produção de biofilmes e a manutenção das bactérias no ambiente (GIBSON et al., 2007).

Uma proteína da membrana externa da família dos autotransportadores o ShdA, cujo domínio passageiro se liga às proteínas da matriz extracelular fibronectina e colágeno I, possivelmente por mimetizar o ligante do hospedeiro. A sua função se baseia na ligação da matriz extracelular mediada por ShdA que é necessário para a eliminação fecal eficiente e prolongada de *S. Typhimurium* em modelos de camundongos, se demonstrando um mecanismo para a persistência intestinal. Isso levanta a questão de saber se esse locus pode mediar a aderência de *Salmonella* em outras estruturas clinicamente importantes conhecidas como focos de



infecção metastática, como artérias e ossos (KINGSLEY et al., 2000, 2002a, 2004).

Uma segunda proteína autotransportadora de *S. Typhimurium* é codificada pelo gene *misL*, localizado na ilha de patogenicidade SPI3, MisL é uma adesina de matriz extracelular envolvida na colonização intestinal, o seu mecanismo se baseia em que o domínio passageiro MisL permite que o sorotipo Typhimurium estabeleça uma ligação da fibronectina à superfície da célula bacteriana, resultando na fixação com fibronectina e também em maior capacidade de invasão a células epiteliais humanas (DORSEY et al., 2005).

Outro gene relevante o *sinH* está envolvido na colonização e persistência intestinal, assim como o gene *ratB*. O produto da expressão do gene *sinH* exibe homologia com a invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* (49,5% de identidade) e intimina de *E. coli* O111 (*E. coli* enteropatogênica) (48% de identidade). Estas servem como âncoras, atravessando a membrana externa da bactéria. Os três fatores de colonização intestinal putativos SinH, RatB e ShdA, estão localizados na mesma ilha de patogenicidade de 25 kb, chamada CS54. Esta ilha está presente apenas na subespécie 1 de *S. enterica* (KINGSLEY et al., 2003).

A invasão pode ser alcançada por vários mecanismos diferentes como por exemplo:

- A *Salmonella* pode se ligar seletivamente a células epiteliais especializadas que recobrem as placas de Peyer no cólon, conhecidas como células M. Essas células são um importante portal de entrada de *Salmonella* e outros patógenos no sistema linfóide submucoso. As células M são altamente endocíticas e podem transferir rapidamente material do lado luminal para o lado basal, onde residem as células T e as células apresentadoras de antígeno, prontas para induzir uma resposta imune (KOHATA; YOKOYAMA; YABUCHI, 1986).

- Tem sido sugerido que as células do epitélio colunar também podem ser uma importante porta de entrada comum para *Salmonella*,

particularmente porque superam em muito as células M (HUGHES; GALÁN, 2002).

- As salmonelas também podem induzir células não fagocíticas, como os enterócitos, a internalizá-las. Este processo de endocitose mediada por bactérias tem sido extensivamente estudado *in vitro* e parece ser importante na patogênese da gastroenterite por *Salmonella* (FINLAY; GUMBINER; FALKOW, 1988; PACE; HAYMAN; GALÁN, 1993).

- Numerosos pequenos focos de *solitary intestinal lymphoid tissues* (SILTs) com uma forte resposta inflamatória podem ser encontrados no intestino delgado murino; *Salmonella* pode ser observada dentro desses SILTs nos estágios iniciais da infecção, e os SILTs podem atuar como portas de entrada (HALLE et al., 2007).

Após a invasão na célula, as bactérias permanecem dentro de um fagossomo modificado conhecido como vacúolo contendo *Salmonella*, dentro do qual elas sobreviverão e se replicarão. Os sistemas de secreção do tipo III são usados para translocar proteínas efetoras bacterianas para a célula hospedeira, mediando tanto a invasão quanto a biogênese do vacúolo. A biogênese de vacúolos é um processo complexo e dinâmico que envolve extensa remodelação da membrana, interações com a via endolisossomal, rearranjos de actina, movimento baseado em microtúbulos e extensão de túbulos (STEELE-MORTIMER, 2008). A sinalização mediada pelo interferon 1 e o controle da função lisossomal parecem modular a morte das células epiteliais intestinais e a disseminação sistêmica de *Salmonella* (ZHANG et al., 2020).

### 1.3.3 Ilhas de patogenicidade

Duas "ilhas de patogenicidade" de *Salmonella* são as mais discutidas, denominadas SPI-1 e 2, cada uma com cerca de 40 quilobases de DNA e localizadas nos centrossomos 63 e 30 do cromossomo, respectivamente

(BEHLAU; MILLER, 1993; GALÁN, 1996; HUECK et al., 1995; LEE; JONES; FALKOW, 1992; OCHMAN et al., 1996; SHEA et al., 1996). Ambas as SPIs codificam múltiplos fatores de virulência, incluindo sistemas de secreção do tipo III (T3SS). O T3SS cria um aparelho hipodérmico semelhante a uma agulha e injeta proteínas nas células, facilitando a absorção das bactérias nessas células. A SPI-1 codifica *operons* como *inv*, os quais contêm genes como *invA* necessários para a invasão de células não fagocíticas através de um mecanismo de *ruffles* e iniciação de respostas secretoras e inflamatórias intestinais. A SPI-2 é induzida dentro da célula e contém genes necessários para a sobrevivência e replicação dentro dos macrófagos (HENSEL et al., 1998). Alguns desses genes induzem respostas secretoras e inflamatórias como o gene *sopB* (GALYOV et al., 1997; WATSON et al., 1995).

O gene *sopB* é essencial na enteropatogenicidade de *Salmonella*, levando a um influxo agudo de células inflamatórias, secreção de fluidos e enterite que se correlacionam com diarreia clínica (ZHANG et al., 2002). O gene *sopB* também é descrito por formar uma proteína efetora de múltipla função que pode facilitar a captação e invasão em conjunto com o T3SS (AWAD et al., 2020; GIBSON et al., 2007). É importante destacar que o gene *invA* é considerado alvo para a detecção do gênero *Salmonella* (BORGES et al., 2016).

Alguns desses genes em SPI-1 codificam proteínas homólogas às proteínas *Shigella* que direcionam a exportação e translocação de moléculas sinalizadoras capazes de interagir com células eucarióticas (GALÁN, 1996; HUECK et al., 1995). As proteínas secretadas de *Salmonella* e *Shigella* induzem projeções *ruffles* nas membranas das células eucarióticas que subsequentemente invaginam e internalizam a bactéria invasora dentro de um vacúolo ligado à membrana, chamado macropinocitose, característica importante para virulência de *Salmonella* (FRANCIS et al., 1993). O *operon* de invasão (*inv*) também pode induzir a adesão (QUINN, 2005).

Esses sistemas de secreção facilitam a entrada bacteriana, a replicação dentro das células e a reprogramação transcricional da célula-alvo por meio de proteínas efetoras que, embora altamente conservadas em

diferentes sorotipos, têm diferenças suficientes para explicar as variações nas apresentações clínicas. Analisando as respostas transcricionais de células epiteliais cultivadas infectadas com *S. Typhi* e *S. Typhimurium*, estudos encontraram impressões digitais transcricionais específicas de sorotipo que se correlacionaram com a ativação de vias de transdução de sinal específicas e proteínas efetoras, o que pode ajudar a explicar as variações nos mecanismos patogênicos e doenças clínicas (HANNEMANN; GALÁN, 2017).

Dentro da análise dos componentes de virulência em *Salmonella*, é de grande importância também a pesquisa de genes como, *sifA*, *sopB* e *sopE*. Tais genes codificam proteínas efetoras secretadas pelo sistema T3SS. Segundo OLIVEIRA et al., 2002, é importante procurar esses genes, pois, a detecção de possíveis mudanças no repertório dessas proteínas resultantes podem significar alterações na capacidade dos sorotipos de *Salmonella* de se adaptarem a novos hospedeiros, permitindo então, que esses genes se tornem emergentes e possam estar relacionados ao aparecimento de surtos de salmonelose.

Os genes de virulência como, *sipA* e *sopE* estão envolvidos na adesão celular epitelial, na invasão celular de fagócitos e não fagócitos e são codificados pela SPI-1. A SPI-2 também codifica genes como *ssaR* que favorecem a sobrevivência e replicação dentro de macrófagos e subsequente disseminação sistêmica (YOON et al., 2009; ZHANG et al., 2003).

As proteínas efetoras SopA, SopB e SopD estão relacionadas com os sintomas de diarreia. A proteína SopB, uma fosfatase de inositolfosfato, estimula a perda de eletrólitos e a secreção de fluídos das células epiteliais para o lúmen intestinal e, assim como SopE, também exerce um papel na promoção de respostas inflamatórias (HANSEN-WESTER; HENSEL, 2001; HU et al., 2017; ILYAS; TSAI; COOMBES, 2017; WOOD et al., 2004). A maioria das proteínas efetoras secretadas pela SPI-1 (SopA, SopB, SopE, SopE2, SipA e SipC) colaboram com o estabelecimento do processo inflamatório por intermédio da produção de IL-8 através da ativação da

casca de fosforilação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK) e NF- $\kappa$ B, causando a desestabilização das *zonulas ocludens* e a migração de neutrófilos para o lúmen intestinal (LAROOCK; CHAUDHARY; MILLER, 2015).

Os genes *flgK*, *fljB* e *flgL* que codificam para proteínas associadas ao flagelo bacteriano, tem um importante papel para a patogênese de *Salmonella*, pois atuam promovendo motilidade a bactéria no meio em que se encontra (JAJERE, 2019; SHAH et al., 2011; WOZNIAK; CHEVANCE; HUGHES, 2010).

#### 1.3.4 Mecanismos de resposta inflamatória

O lipídio A é o componente biologicamente ativo do LPS encontrado na parede celular de *Salmonella* e outras bactérias gram-negativas. O lipídio A é tóxico para células de mamíferos e é um potente imunomodulador. Certas características do lipídio A em *Salmonella* podem se correlacionar com a virulência ou com a ativação da inflamação do hospedeiro (FINLAY; FALKOW, 1988; RAHMAN; GUARD-PETTER; CARLSON, 1997). O lipídio A induz respostas mediadas pelo receptor *toll-like* 4 (TLR4), que são importantes para a defesa do hospedeiro contra a infecção por *Salmonella*, e modificações no lipídio A como parte da adaptação da *Salmonella* aos ambientes do hospedeiro reduzem essa sinalização (KAWASAKI; ERNST; MILLER, 2004).

As modificações estruturais do lipídio A são influenciadas pelo locus regulador da virulência da *Salmonella* (PhoP/PhoQ) que responde a uma variedade de sinais ambientais intracelulares do hospedeiro (GUO et al., 1997). A expressão do gene *mig-14* é induzida em macrófagos e está sob o controle do regulador global PhoP, Mig-14 é uma proteína associada à membrana interna, necessária para a proliferação bacteriana no fígado e baço. Ela pode prevenir a penetração da membrana interna pelo peptídeo

antimicrobiano relacionado à catelina (CRAMP), um peptídeo antimicrobiano expresso em níveis elevados em macrófagos de camundongo ativados. Essa resistência é importante para a sobrevivência da *Salmonella* em locais sistêmicos durante a infecção aguda e persistente (BRODSKY et al., 2002, 2004; VALDIVIA et al., 2000).

### 1.3.5 Sobrevivência dentro dos fagócitos

Sabe-se há muito tempo que *Salmonella* persiste dentro do sistema reticuloendotelial. Os macrófagos podem ser o principal tipo de célula para suportar o crescimento bacteriano *in vivo*, e esse crescimento é regulado tanto pelo hospedeiro quanto pela *Salmonella* (GARCÍA-DEL PORTILLO, 2001). A capacidade da *Salmonella* de sobreviver dentro dos macrófagos contribui para a disseminação do micro-organismo da submucosa para a circulação sanguínea e para o sistema reticuloendotelial. O crescimento bacteriano intracelular dentro dos fagócitos é limitado por mecanismos que requerem intermediários reativos de oxigênio, transportadores de magnésio (YEOM; SHAO; GROISMAN, 2020).

O locus *mgtBC* codifica duas proteínas e foi identificado como parte de uma nova ilha de patogenicidade SPI-3, os genes relacionados *mgtB* e *mgtC*, atuam como fatores de virulência interferindo no fator nutricional e metabólico, relacionado a absorção de metal, esse fator é hipotetizado para ser um transportador de magnésio, onde *mgtC* é essencial para ambas as funções, tanto para sobrevivência intracelular ou para virulência (MONCRIEF; MAGUIRE, 1998; SMITH; MAGUIRE, 1998; TAO et al., 1995, 1998).

Conforme descrito na literatura, a maioria dos genes de virulência contribui diretamente na patogenicidade e têm demonstrado desempenhar papéis importantes como invasão, adesão e patogênese, indução

aumentada de gastroenterite, infecção focal de órgão e doença febril sistêmica em animais e humanos (MOUSSA et al., 2013).

## **1.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS**

### **1.4.1 Conceito**

A resistência aos antimicrobianos (AMR) é um dos maiores desafios para a saúde pública, com importante impacto na saúde humana e animal, e, por esse motivo, considerando a abordagem de Saúde Única (*One Health*), a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) trabalha em estreita colaboração com outras instituições internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Comissão do *Codex Alimentarius* (MAPA, 2022).

Embora o desenvolvimento da AMR seja um fenômeno natural dos microrganismos, está ocorrendo uma maior pressão seletiva e disseminação no mundo por: mau uso de medicamentos antimicrobianos veterinários e humanos; programas inadequados ou inexistentes de prevenção e controle de infecções, o que favorece a transmissão da resistência entre os microrganismos e a exposição de indivíduos a microrganismos resistentes; antimicrobianos de má qualidade; fraca capacidade laboratorial; vigilância e monitoramento inadequados; insuficiente regulamentação e fiscalização do uso dos medicamentos antimicrobianos veterinários e humanos (MAPA, 2022).

A fim de prevenir e controlar a resistência aos antimicrobianos, o tema está sendo tratado no contexto mundial e nacional respeitando-se a abordagem de Saúde Única, o que requer o trabalho em conjunto da saúde humana, animal e ambiental. Os antimicrobianos são medicamentos

utilizados no tratamento de infecções, principalmente as de origem bacteriana, e são essenciais para a preservação da saúde humana e animal, bem como do bem-estar animal. Entretanto, nas últimas décadas, o mundo enfrenta uma aceleração no surgimento de resistência aos antimicrobianos. O uso excessivo ou inadequado de antimicrobianos leva ao aparecimento de bactérias resistentes à ação dessas drogas, e esse fenômeno coloca em risco o controle de doenças em humanos e animais em todo o mundo. A única maneira de preservar a eficácia desses valiosos medicamentos é garantindo o uso responsável e prudente, e para isso, é fundamental que haja ações coordenadas entre os setores de saúde humana, saúde animal e saúde ambiental (MAPA, 2022).

#### **1.4.2 Tratamento com antimicrobiano**

Geralmente não é recomendado o tratamento com antimicrobiano para indivíduos imunocompetentes entre 12 meses e 50 anos de idade que tenham documentado gastroenterite por *Salmonella* com sintomas leves a moderados, pois a doença é tipicamente autolimitada (ONWUEZOBE; OSHUN; ODIGWE, 2012). Uma meta-análise de 12 estudos que incluiu 767 indivíduos saudáveis com gastroenterite por *Salmonella* não tifóide não encontrou nenhum benefício significativo da terapia antimicrobiana durante o período da doença, diarreia ou febre em casos não graves (ONWUEZOBE; OSHUN; ODIGWE, 2012). Os principais riscos do tratamento incluem os efeitos adversos do agente antimicrobiano (incluindo a pressão seletiva da resistência antimicrobiana) e o potencial para selecionar portadores assintomáticos de *Salmonella* (ONWUEZOBE; OSHUN; ODIGWE, 2012).

O tratamento antimicrobiano com fluorquinolonas e cefalosporinas de espectro estendido, especialmente ceftriaxona, pode ser indicado para crianças e pacientes imunocomprometidos com infecções invasivas ou graves causadas por *Salmonella* (FOLSTER et al., 2011; GONZALEZ-SANZ



et al., 2009). A diminuição da sensibilidade às fluorquinolonas e o aumento da resistência às cefalosporinas de espectro estendido em *Salmonella* limitam o uso terapêutico dessas drogas e constituem um sério problema de saúde pública (GONZALEZ-SANZ et al., 2009; SEIFFERT et al., 2013; WHICHARD et al., 2007).

Os  $\beta$ -lactâmicos, devido à sua segurança, propriedades de eliminação confiáveis e eficácia clínica, estão entre os antimicrobianos mais frequentemente prescritos para tratar infecções bacterianas. No entanto, sua utilidade está sendo ameaçada pela proliferação mundial de  $\beta$ -lactamases (BLs) com amplas capacidades hidrolíticas, especialmente em bactérias gram-negativas multirresistentes. Já os carbapenens apresentam amplo espectro de atividade e constituem a terapia de escolha para pacientes com infecções hospitalares graves ou para aquelas infecções causadas por micro-organismos resistentes às penicilinas e cefalosporinas disponíveis, devido à sua elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina do tipo 2 (PBP2), estabilidade à frente de muitas  $\beta$ -lactamases, incluindo as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e as cromossômicas (AmpC) e excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana (GALES et al., 2002).

### **1.4.3 Mecanismos de resistência**

A transferência horizontal de genes (THG) é um pilar da evolução bacteriana, junto com mutação, deriva genética, seleção e dispersão. Existem diversos meios para a bactéria transferir seu material genético de um genoma bacteriano para outro, os três mecanismos clássicos são transformação, transdução e conjugação. A transformação é a absorção de DNA do ambiente, a transdução depende de fagos, enquanto a conjugação é a transferência por contato direto, sendo o exemplo clássico a

transferência de plasmídeo por meio de um *pilus* conjugativo (ARNOLD; HUANG; HANAGE, 2022).

A determinação dos mecanismos de resistência antimicrobiana é importante para fins de vigilância, e pode ser realizada periodicamente para monitorar o desenvolvimento, e a disseminação da resistência antimicrobiana entre isolados de *Salmonella*. Em contraste com casos de salmonelose não complicada, o tratamento com o agente antimicrobiano apropriado, pode ser crucial para pacientes com *Salmonella* invasiva e infecções tifóide, e a resistência desses isolados devem ser relatadas (LEE et al., 1994).

A resistência antimicrobiana pode variar de acordo com o sorotipo em *Salmonella*, e a resistência a várias classes de antimicrobianos é uma preocupação em saúde pública (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Em 2011, 9,1% dos isolados de *Salmonella* testados como parte do *National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria* (NARMS) eram resistentes a três ou mais classes de medicamentos de acordo com o *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI). Em particular, 26, 27 e 30% dos sorotipos Typhimurium, I 4,[5]12:i:- e isolados de Heidelberg, respectivamente, eram resistentes a três ou mais classes de acordo com o CLSI (CDC, 2013).

MEDALLA et al., 2021 demonstraram em um estudo realizado nos Estados Unidos, que cepas de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos representam uma séria ameaça à saúde pública, uma vez que, foi estimado um aumento de 40% na incidência anual de infecções com resistência clinicamente importante relacionadas à ampicilina ou ceftriaxona ou resistência à ciprofloxacina, durante os anos de 2015-2016 (≈222.000 infecções) em comparação com os anos de 2004-2008 (≈159.000 infecções). As infecções por bactérias resistentes à ciprofloxacina foram responsáveis por mais da metade do aumento de casos de resistência antimicrobiana.

A ocorrência de  $\beta$ -lactamase do tipo AmpC (AmpC) mediada por plasmídeo, particularmente *bla*<sub>CMY-2</sub>, foi relatada em sorotipos de *Salmonella*

isolados de infecções humanas e fontes não humanas em vários países (BATCHELOR et al., 2005; CEJAS et al., 2014; CORDEIRO et al., 2013; DHANANI et al., 2015; EGOROVA et al., 2008; KEELARA; THAKUR, 2014; MARTIN et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2009).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos ocorre por diversos mecanismos, sendo a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases o de maior interesse em bactérias Gram-negativas. Estas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, inativando assim, a ação de vários antimicrobianos pertencentes a este grupo (TURNER, 2005). A primeira  $\beta$ -lactamase mediada por genes plasmidiais em bactérias Gram-negativas foi a TEM-1, que hidrolisou ampicilina em *E. coli* no início da década de 60 e disseminou-se por todo o mundo. Outra  $\beta$ -lactamase frequentemente mediada por genes plasmidiais em *E. coli* e por genes cromossômicos em *K. pneumoniae* é a SHV-1 (JACOBY, 2009). No início da década de 80, as cefalosporinas de 3ª geração (oxiamino-cefalosporinas), como a ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e cefpodoxima, foram instituídas como alternativas terapêuticas para infecções graves, provocadas principalmente por bactérias gram-negativas produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro restrito como TEM-1 e SHV-1 (BUSH; JACOBY, 2010). A produção de ESBL por enterobactérias é o mecanismo de resistência mais comum aos antimicrobianos beta-lactâmicos de amplo espectro e as ESBL são inibidas *in vitro* pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BHAVNANI et al., 2006).

As  $\beta$ -lactamases foram divididas de acordo com suas sequências de aminoácidos em quatro classes (A a D), segundo (AMBLER, 1980). E, de acordo com as diferenças em seus mecanismos catalíticos, estas classes ainda podem ser classificadas dentro de dois grupos: serina- $\beta$ -lactamases (classes A, C e D) e metalo- $\beta$ -lactamases (classe B) (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; ROSSOLINI, 2005).

Embora diferentes BLs fossem conhecidas no início dos anos 1970, o número de BLs desde então tem crescido rapidamente, especialmente com novas enzimas descritas, e a disseminação atual de algumas enzimas em

isolados clínicos que sofrem alterações em seus aminoácidos, produzindo novas propriedades hidrolíticas. As enzimas de classe A (conhecidas principalmente como penicilinases) tendem a hidrolisar as penicilinas e algumas cefalosporinas de gerações inferiores, embora muitas variantes possam hidrolisar cefalosporinas e carbapenêmicos de amplo espectro de maneira significativa. As enzimas de classe B (metalo- $\beta$ -lactamases) normalmente têm uma especificidade de substrato de espectro extremamente amplo, incluindo todos as  $\beta$ -lactamases, exceto monobactâmicos (aztreonam). As enzimas de classe C (cefalosporinases) tendem a preferir as cefalosporinas como substratos, enquanto as enzimas de classe D (oxacilinases) têm uma preferência de substrato incomumente alta para oxacilina e penicilinas relacionadas. Atualmente existem compiladas no *Beta-lactamase database* (BLDB) informações de 3620 seqüências de enzimas de classe C, bem como informações bioquímicas e estruturais sobre todas as  $\beta$ -lactamases atualmente conhecidas (NAAS et al., 2017).

Um grupo de enzimas com sítio ativo de serina e capazes de hidrolisar cefalosporinas são as  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, as quais são resistentes aos inibidores clavulanato, sulbactam, tazobactam, e, portanto, não são classificadas como ESBL. Essas enzimas são cromossomais ou plasmidiais, e pertencem ao grupo 1 na classificação de Bush-Jacoby-Medeiros e ao grupo C na classificação de Ambler (JACOBY, 2009). A detecção de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC pode ser realizada pela triagem inicial baseada na diminuição da sensibilidade a cefoxitina (halo  $\leq$  14mm). Em cepas de *Salmonella* spp. tem se observado a resistência a cefalosporinas através da transmissão de plasmídios contendo genes que codificam a enzima  $\beta$ -lactamase do tipo AmpC (pAmpC) mais comum: CMY-2 (LEE et al., 2014). Diferentes genes *ampC* foram identificados e são utilizados para a detecção deste grupo: *bla<sub>CMY</sub>*, *bla<sub>FOX</sub>*, *bla<sub>ACC</sub>*, *bla<sub>LAT</sub>*, *bla<sub>MIR</sub>*, *bla<sub>ACT</sub>*, *bla<sub>MOX</sub>*, *bla<sub>CFE</sub>* e *bla<sub>DHA</sub>* (JACOBY, 2009; PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002).

Resultados do monitoramento de resistência antimicrobiana, realizados rotineiramente para sorotipos de *Salmonella*, identificados no Instituto Adolfo Lutz (IAL), evidenciaram cepas multirresistentes de *S. Typhimurium* produtoras de ESBL, detectadas pela primeira vez no estado de São Paulo, cujos genes de resistência foram caracterizados como CTX-M-2, presentes em cepas clínicas e de origem aviária (FERNANDES et al., 2009). Os resultados deste estudo demonstraram a similaridade genética entre as cepas de *Salmonella* produtoras de ESBL isoladas de crianças hospitalizadas, bem como de aves e seu ambiente, reforçando a importância de implementar medidas de controle para minimizar o desenvolvimento de resistência antimicrobiana, em bactérias que causam zoonose tal como, *Salmonella* spp. FERNANDES et al., 2017 encontraram em isolados de *Salmonella* provenientes de origem clínica, animal e ambiental, a predominância das enzimas CTX-M-2 e CTX-M-8 entre os diferentes sorotipos de *Salmonella enterica*.

No Brasil, a produção de ESBL em *Enterobacteriaceae* é alarmante, uma vez que variantes do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES e VEB têm sido descritas (TOLLENTINO et al., 2011; VASQUES et al., 2011). As enzimas pertencentes à família CTX-M são predominantemente detectadas na América do Sul e no Brasil, sendo frequentemente isolados os grupos CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M15 (ANDRADE et al., 2010; DE OLIVEIRA GARCIA et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; ROCHA et al., 2019). Na região sudeste do Brasil, as variantes CTX-M2 e CTX-M15 são predominantemente detectadas (ROCHA et al., 2019).

A falha da terapia com ciprofloxacino devido ao desenvolvimento de resistência em isolados clínicos de *Salmonella* foi reportada pela primeira vez em 1990 (PIDDOCK, 1990). A resistência a fluorquinolonas já é considerada comum e não mais rara em *Salmonella*. Nas últimas décadas o significativo aumento da resistência ao ácido nalidíxico tornou-se de grande interesse em saúde pública, por estar relacionado com a redução da susceptibilidade a ciprofloxacino, e a possibilidade da emergência de cepas

resistentes, interferindo diretamente na resposta ao tratamento clínico (EAVES et al., 2004; MURRAY et al., 2005; STEVENSON et al., 2007).

Provavelmente o uso na medicina humana e veterinária tem contribuído significativamente para a emergência de cepas de *Salmonella* resistentes a fluorquinolonas. Essa evolução é de interesse, uma vez que, a resistência a fluorquinolonas é frequentemente acompanhada por multirresistência para outras importantes classes de antimicrobianos terapêuticos (GIRAUD; BAUCHERON; CLOECKAERT, 2006).

O alvo primário da ação de quinolonas em Gram-negativos é a topoisomerase II (também denominada DNA girase), enquanto a topoisomerase IV é o alvo secundário (BATCHELOR et al., 2005; PIDDOCK, 2002). A DNA-girase é composta por duas subunidades A (GyrA) e B (GyrB), codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente. A topoisomerase IV, consiste em duas subunidades C (ParC) e E (ParE), codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respectivamente. Diversos estudos demonstram que a resistência a quinolonas surgiu devido a mutações cromossômicas em genes constitutivos, as quais resultavam na substituição de aminoácidos nas enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, alvos da ação destes antimicrobianos. Em *Salmonella* spp., resistência às quinolonas se deve principalmente a alterações no sítio de ligação do antimicrobiano com a DNA-girase, devido a mutações em uma região específica do gene *gyrA*, entre os aminoácidos 67 e 106, denominada região determinante de resistência à quinolona (QRDR) (BATCHELOR et al., 2005; PIDDOCK, 2002).

Mutações pontuais na região QRDR do gene *gyrA* podem ser suficientes para gerar altos níveis de resistência para o ácido nalidíxico, além de reduzir a susceptibilidade a ciprofloxacino. No entanto, mutações adicionais podem ser requeridas para atingir altos níveis de resistência para fluorquinolonas (ciprofloxacino), embora cepas com susceptibilidade reduzida possam levar à falha no tratamento clínico com estes antimicrobianos. Mutações no gene *parC* das topoisomerasas IV ocorrem

menos frequentemente e as mutações nos genes *gyrB* e *parE* têm sido consideradas raras em *Salmonella* (BATCHELOR et al., 2005).

A descoberta da resistência adquirida a quinolonas, a qual tem sido associada à transferência horizontal de genes mediada por plasmídios ou *Plasmid-mediated quinolone resistance* (PMQR), é de grande interesse, e veio acrescentar uma nova dimensão ao problema da resistência a esta classe de antimicrobianos, uma vez que, há novas possibilidades para disseminação da resistência (CAVACO et al., 2009). Diferentes mecanismos de resistência mediados por plasmídios têm sido descritos, sendo que, um destes é a proteção das enzimas alvo por proteínas Qnr (*Quinolone resistance*), as quais pertencem a uma família de pentapeptídios que protegem a DNA girase e topoisomerase IV da inibição das quinolonas (PÉREZ-MORENO et al., 2013; YANG et al., 2013). A Tabela 1 mostra todos os antimicrobianos pesquisados no estudo, dividida de acordo com cada classe.

Os outros dois mecanismos de resistência adquirida incluem: inativação enzimática por uma variante de uma aminoglicosídeo acetil transferase, *aac(6')-Ib-cr*, codificada por um gene plasmidial, que reduz a atividade ou inativa a ciprofloxacina e norfloxacina (CAVACO; AARESTRUP, 2009) e bombas de efluxo proteicas (QepA e OqxAB) codificadas por genes plasmidiais, que promovem a expulsão de fluorquinolonas para fora da célula bacteriana. A bomba de efluxo OqxAB foi encontrado em isolados clínicos de *E.coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* (ANDRES et al., 2013).

Tabela 1 - Classes e antimicrobianos pesquisados no estudo.

Betalactâmicos	Tetraciclinas
AMP - Ampicilina	TE - Tetraciclina
AMC - Amoxicilina-ácido clavulânico	
FOX - Cefoxitina	Quinolonas
CTX - Cefotaxima 30	CIP - Ciprofloxacina
CRO - Ceftriaxona	NA - Ácido nalidíxico
CAZ - Ceftazidima	PEF - Pefloxacina
FEP - Cefepime	
ATM - Aztreonam	Sulfonamidas
IPM - Imipenem	SXT - Sulfametoxazol-trimetoprima
	S3 - Sulfonamida
Aminoglicosídeos	
CN - Gentamicina	Fenicóis
AK - Amicacina	C - Cloranfenicol
S - Estreptomicina	

## 1.5 METODOLOGIAS DE TIPAGEM BACTERIANA

A sorotipagem é tradicionalmente um importante método de tipagem que permite identificar sorotipos de *Salmonella* circulantes em um país, reservatórios e alimentos, além de identificar sorotipos associados à doença transmitida por alimentos (DTAs). Esta técnica é essencial para a detecção de surtos, cujos resultados podem contribuir para priorizar intervenções na segurança alimentar, e implantar medidas de controle apropriadas (HENDRIKSEN et al., 2009; OLSEN et al., 1993).

Entre os diferentes métodos utilizados para caracterizar cepas pertencentes a diferentes sorotipos de *Salmonella*, o PFGE é o método mais amplamente utilizado por muitos laboratórios. Devido seu poder altamente discriminatório, PFGE tem sido o método para a vigilância e investigação de DTAs que permite determinar a relação entre as cepas, confirmar um surto de DTA, e identificar fontes de origem de uma cepa ou surto (WATTIAU; BOLAND; BERTRAND, 2011; ZOU; KEELARA; THAKUR, 2012).



O método de sub-tipagem molecular *Whole Genome Sequencing* (WGS), refere-se ao sequenciamento em larga escala, que permite identificar diferenças genéticas, fatores de virulência e mecanismos de resistências aos antimicrobianos. Esta técnica vem possibilitando o aumento da capacidade de identificar e investigar clones que possam parecer desconectados por estarem geograficamente distantes, além de distingui-los dos casos de ocorrência esporádica ao mesmo tempo. Esta técnica vem agilizando o teste de diagnóstico laboratorial de *Salmonellas* em um único fluxo de trabalho, englobando testes fenotípicos de identificação, sorológicos e genotípicos menos robustos. Por exemplo, análise de WGS podem ser facilmente direcionados por condutas de bioinformática para prever padrões de susceptibilidade antimicrobiana, determinar o sorotipo e fornecer vários perfis de virulência para uma única cepa de *Salmonella* (BEKAL et al., 2016; ZANKARI et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Um trabalho realizado na Dinamarca, mostrou que os dados de WGS foram canalizados para o servidor *web ResFinder* ([www.genomicepidemiology.org](http://www.genomicepidemiology.org)) e identificaram concordância de 100% na previsão de perfis de resistência de *S. Typhimurium* quando comparados com os dados fenotípicos (ZANKARI et al., 2013). Além disso, os sorotipos de *Salmonella* também podem ser previstos a partir de dados WGS com o uso do programa *SEQSERO*, prevendo os antígenos O e H com alta precisão, quando comparados com os dados de sorotipagem tradicionais (ZHANG et al., 2015).

A utilização da plataforma de WGS na caracterização da resistência antimicrobiana, numa população tem vantagens comparadas às metodologias genotípicas disponíveis atualmente, particularmente àqueles que ainda não foram completamente caracterizados e que são passíveis de sofrer recombinação. Essa resistência pode ser mediada por plasmídeos, cuja importância é decorrente de seu potencial de disseminação. Nos últimos anos, o aumento da resistência antimicrobiana observada para os diferentes patógenos, incluindo *Salmonella*, tem sido de grande interesse em saúde pública no nosso país, assim como em nível global. A multirresistência em *Salmonella* tem se agravado em decorrência do uso

indiscriminado de agentes antimicrobianos, na terapêutica e profilaxia humana e veterinária (SU et al., 2004; WEILL et al., 2006).

Do ponto de vista evolutivo e populacional, as comparações genômicas em larga escala podem elucidar a complexidade da estrutura populacional de patógenos, até então desconhecidas devido às limitações metodológicas. Essas informações, associadas aos conhecimentos epidemiológicos clássicos, podem indicar causas para mudanças de perfis fenotípicos e transcricionais ocorridas ao longo do tempo, refletindo na fixação de determinantes de virulência e de resistência e na disseminação de determinados clones na população. A caracterização dessa dinâmica é útil nas intervenções de monitoramento e controle da disseminação de patógenos.

### **1.5.1 Análise de *single-nucleotide polymorphisms* (SNPs)**

A tipagem de cepas por WGS com base na análise de SNPs pode ser realizada por meio de mapeamento baseado em *contigs* montados contra um genoma de referência. A abordagem de SNPs pode fornecer uma resolução muito alta, mas um genoma de referência que esteja intimamente relacionado às amostras sequenciadas deve ser utilizado. Isso reduz as chances de mapeamento incorreto e aumenta as regiões presentes no genoma de referência para as quais as leituras serão mapeadas. A chance de mapeamento incorreto aumenta e o número de bases mapeadas diminui se um conjunto diverso de amostras for mapeado contra uma referência arbitrária. Idealmente, as amostras analisadas também estão intimamente relacionadas, por exemplo em casos de surtos. Uma desvantagem da abordagem baseada em SNP é a baixa comparabilidade entre diferentes estudos, especialmente se diferentes genomas de referência são usados, e a possível adoção de diferentes configurações de limite, como os

parâmetros pelos quais um SNP será verificado pelo *software* de análise (SCHÜRCH et al., 2018).

### **1.5.2 *Multilocus sequence typing (MLST)***

Os esquemas de MLSTs são conhecidos como uma ferramenta para estudos epidemiológicos para investigar as vias evolutivas e linhagens clonais de bactérias. O esquema avalia apenas as informações das regiões de codificação, e abrangem diferentes tipos de mutações em uma única mudança alélica. A informação dos alelos é avaliada comparando novas sequências com um banco de dados de alelos que contém todos os genes (*loci*) presentes nas diversas amostras usadas para criar o esquema. O número dos genes avaliados pode variar de tipicamente sete genes *housekeeping* para milhares de genes (ACHTMAN et al., 2012; MAIDEN et al., 2013). Para *Salmonella*, sete tipos de sequência de locus MLST *sequence type* (STs) podem ser gerados com protocolos facilmente replicáveis (MAIDEN et al., 1998) e se correlacionam bem com a maioria das linhagens e serovares por meio de grupos eBurst. Nas ocasiões em que o MLST é incapaz de resolver linhagens geneticamente distintas, isso é um reflexo da genealogia da espécie, visto que essas linhagens costumam ser intimamente relacionadas ou recombinantes (ACHTMAN et al., 2012). Embora o MLST de sete *locus* não tenha a resolução necessária para a identificação de surtos distintos causados por variantes bacterianas intimamente relacionadas, a chegada de tecnologias de sequenciamento de alto rendimento levou a análises cada vez mais acessíveis e práticas de WGS, o que permitiu a caracterização de isolados de alta resolução.

### 1.5.3 Core genome MLST (cgMLST)

Para o monitoramento da rotina em saúde pública e para manter a comparabilidade entre laboratórios, o *gene-by-gene*, ou seja, a abordagem *core genome* ou *whole genome* MLST demonstra ser uma ferramenta muito robusta. Os esquemas maiores contêm os genes presentes em quase todas as cepas da mesma espécie, e é chamado *core genome multilocus sequence typing* (cgMLST), já o *whole genome multilocus sequence typing* (wgMLST) quando todos os principais genes mais os genes acessórios são usados para criar o banco de alelos (MAIDEN et al., 2013; NADON et al., 2017).

Um esquema cgMLST geralmente é um pouco menos discriminatório do que um esquema feito com uma abordagem "semelhante ao SNP", mas mais adequado para análises prospectivas. No entanto, quando o cgMLST e os genes acessórios do genoma de um esquema desse tipo são utilizados para análise comparativa, o poder discriminatório é quase tão alto quanto na abordagem "do tipo SNP". O cgMLST visa combinar o poder discriminatório do MLST clássico com os extensos dados genéticos derivados do WGS (NEUMANN et al., 2019). Explorar centenas de alvos genéticos de todo o genoma bacteriano, fornece resolução alta para várias análises de pesquisa e vigilância, sendo uma das maiores vantagens do esquema cgMLST (HIGGINS et al., 2017; KOHL et al., 2014).

## 2 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a diversidade genotípica, verificar a presença de fatores de virulência e os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência aos antimicrobianos, em 32 isolados de *Salmonella* Heidelberg de humanos, aves, alimentos e ambiente através de técnicas clássicas e de sequenciamento de genoma completo.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil fenotípico de resistência a antimicrobianos dos isolados de *S. Heidelberg* através do método de disco-difusão e determinação da concentração inibitória mínima;
- Verificar a presença de genes de resistência a antimicrobianos nos isolados de *S. Heidelberg* utilizando os dados obtidos pelo sequenciamento do genoma completo;
- Identificar por análise de sequenciamento, os genes de virulência presentes nos isolados de *S. Heidelberg*;
- Realizar a caracterização plasmidial por meio da classificação dos grupos de incompatibilidade (*Inc type*) e a tipagem dos plasmídeos por *plasmid multilocus sequence typing* (pMLST) utilizando os dados do genoma completo dos isolados de *S. Heidelberg*;
- Verificar a diversidade genotípica dos isolados de *S. Heidelberg* por PFGE;
- Determinar a relação filogenética e diversidade dos isolados utilizando análise de SNPs e cgMLST, utilizando os dados do sequenciamento de genoma completo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Os isolados de *Salmonella* foram recebidos para identificação no centro de bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, provenientes do município de São Paulo, de outras regiões do estado de São Paulo e de outros estados (Paraná e Santa Catarina) no período de 2010-2021. A relação dos isolados de *Salmonella* Heidelberg de acordo com sítio de isolamento e hospedeiro estão listados na Tabela 2.

Foram estudadas 32 cepas de *S. Heidelberg*, sendo 19 (59,4%) resistentes a cefoxitina e 13 (40,6%) cepas sensíveis a este antimicrobiano. A detecção de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC foi realizada pela triagem inicial baseada na diminuição da sensibilidade a cefoxitina (halo  $\leq$  14mm). A distribuição de cepas de *Salmonella* de acordo com a origem de isolamento está demonstrada no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Distribuição geográfica por cidade dos 32 isolados estudados de *Salmonella* Heidelberg

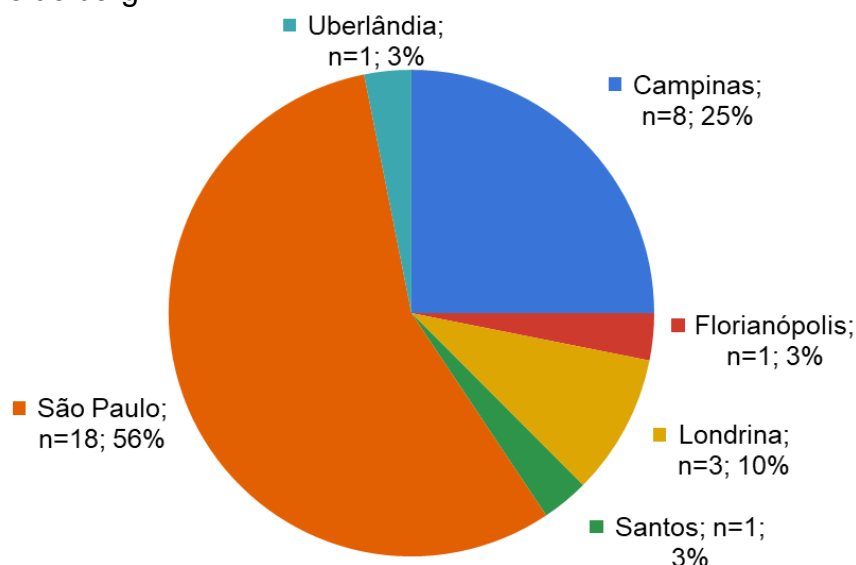


Tabela 2 - Relação dos isolados de *Salmonella* Heidelberg de acordo com sítio de isolamento e hospedeiro.

Sítio de origem	Hospedeiro	n; %
Suabe de arrasto	Superfície de granja	n=3; 9,4%
Alimento	Linguiça de frango e carne processada	n=9; 28,1%
Ave (frango de corte)	Carcaça	n=14; 43,8%
Sangue	Humano	n=1; 3,1%
Fezes	Humano	n=1; 3,1%
Secreção abscesso perianal	Humano	n=1; 3,1%
Urina	Humano	n=3; 9,4%

O núcleo de doenças entéricas e infecções por patógenos especiais no centro de bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz recebe serviços de taxa paga de empresas avícolas que mandam os isolados de *Salmonella* para o laboratório para realizar a sorotipagem. Infelizmente geralmente as amostras não vem com todas as informações sobre a fonte de isolamento. Os isolados deste estudo foram selecionados por conveniência e não por representação ou aleatoriamente. No caso dos isolados de humanos, estes são provenientes de pacientes comprometidos, uma vez que muitos dos pacientes saudáveis não procuram um serviço médico, pois a doença é autolimitada. A etiologia de diarreia como um todo é muito difícil de se chegar na vigilância, por isso não temos uma representação satisfatória das amostras. Os isolados foram identificados com o número da cepa seguido do ano de isolamento, separados pelo símbolo *underline*.

## **3.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE S. HEIDELBERG**

### **3.2.1 Testes de sensibilidade antimicrobiana**

#### **3.2.1.1 Ativação das cepas**

As cepas estudadas foram semeadas em placas de ágar comum ou agar triptona de soja, *tryptic soy agar* (TSA) e incubadas em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas para verificação de pureza da cultura. No dia seguinte, essas cepas foram armazenadas a  $-80^\circ\text{C}$  em caldo triptona de soja (TSB) + glicerol 15% para posterior utilização nos testes.

#### **3.2.1.2 Método de difusão em disco**

Os isolados foram primeiramente testados quanto à sensibilidade aos agentes antimicrobianos pelo método de difusão de disco em ágar Mueller-Hinton (Oxoid) (BAUER et al., 1966), de acordo com as recomendações do CLSI (CLSI, 2021). Estes foram inicialmente, cultivados em placas de ágar TSA (Oxoid) e incubados em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 16-18 horas. No dia seguinte, foi feita uma suspensão bacteriana em solução fisiológica NaCl 0,85% na escala 0,5 de *McFarland* (conc~ $1,5 \times 10^8$  UFC/mL), obtida por meio da leitura em densitômetro (*Densicheck Plus* – Biomérieux).

Em seguida, um suabe estéril (CB *products*) foi imerso nesta suspensão bacteriana e inoculado de forma homogênea na superfície da placa de ágar Mueller-Hinton. Os discos foram aplicados manualmente sobre a superfície do meio de cultura com auxílio de pinça estéril. Os agentes



antimicrobianos empregados (Oxoid) e suas concentrações foram: ampicilina (AMP, 10µg), amoxicilina-ácido clavulânico (AMC, 20/10µg), cefoxitina (FOX, 30µg), cefotaxima (CTX, 30µg), ceftriaxona (CRO, 30µg), ceftazidima (CAZ, 10µg), cefepime (FEP, 30µg), aztreonam (ATM, 30µg), imipenem (IPM, 10µg), gentamicina (CN, 10µg), amicacina (AK, 30µg), estreptomicina (S, 10 µg), tetraciclina (TE, 30µg), ciprofloxacino (CIP, 5µg), ácido nalidíxico (NA, 30µg), pefloxacino (PEF, 5 µg), sulfametoxazol-trimetoprima (SXT, 1,25/23,75µg), sulfonamida (S3, 300µg) e cloranfenicol (C, 30µg).

Após incubação das placas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 16-18 horas, procedeu-se a leitura dos halos de inibição do crescimento bacteriano e a interpretação foi feita por meio das categorias: sensível (SE), intermediário (I) e resistente (R) de acordo com os pontos de corte de cada antimicrobiano descrito no manual do (CLSI, 2021). Para validação e controle de qualidade do teste foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Os isolados que apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos pertencentes a três ou mais classes de antimicrobianos foram considerados multirresistentes (MDR) (MAGIORAKOS et al., 2012).

### **3.2.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por teste epsilométrico (E-test)**

Todas as cepas do estudo foram submetidas ao teste de concentração inibitória mínima para os antimicrobianos CIP e NA. Em uma placa de ágar Mueller-Hinton, a suspensão bacteriana de cada um dos isolados obtida como descrito no item 3.2.1.2, foi semeada de forma homogênea e as fitas contendo os antimicrobianos CIP e NA (E-test®) foram colocadas na superfície da placa com posterior incubação  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 16-20 h. A determinação da CIM foi dada no ponto de intersecção entre a zona de inibição do crescimento bacteriano e a fita impregnada com

antimicrobiano e para interpretação dos resultados da MIC foram considerados os valores descritos no (CLSI, 2021), para CIP SE  $\leq 0,25$  / I 0,5 / R  $\geq 1$  e ácido nalidíxico SE  $\leq 16$  / R  $\geq 32$ . Para controle dos testes de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos foram utilizadas as cepas-padrão: *E.coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### **3.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DOS ISOLADOS DE SALMONELLA**

#### **3.3.1 Extração de DNA para sequenciamento de genoma completo e verificação da pureza e integridade do DNA genômico**

O material genético dos isolados foi extraído utilizando o kit comercial *Wizard Genomic DNA Purification kit* (Promega). Primeiramente, o isolado foi semeado em ágar TSA e no dia seguinte, uma colônia pura foi selecionada e passada para 3 mL de caldo Luria-Bertani (LB) (BD®) e incubado a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 24 horas. Em seguida, 1 mL deste crescimento foi inoculado em microtubo de 1,5 mL (ABDOS) e centrifugado (Microcentrífuga Eppendorf®) por 5 minutos a 13.000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 600 $\mu\text{L}$  da solução de lise e misturado gentilmente, sendo em seguida incubado a  $80^\circ\text{C}$  em termobloco (AccuBlock™) por 5 minutos e posteriormente deixado à temperatura ambiente. Foi adicionado 3 $\mu\text{L}$  de RNase, e o material foi homogeneizado e incubado a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos e em temperatura ambiente por 10 minutos.

Foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  da solução de precipitação de proteína, homogeneizado no vórtex (Labnet), e incubado em gelo por 5 minutos, e em seguida, centrifugado por 3 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi retirado, e transferido para um novo microtubo contendo 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol em temperatura ambiente, seguido de homogeneização. Os

microtubos foram centrifugados por 5 minutos a 13.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e adicionado 600 µL de etanol a 70% temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados novamente por 2 minutos a 13.000 rpm, o etanol foi aspirado, e o DNA extraído ressuspendido em 80 µL de água ultra pura (Promega) e armazenado a 4°C por 24h. No dia seguinte, foram estocados a - 20°C para armazenamento e utilização nos testes.

A integridade do DNA genômico extraído foi verificada com a visualização de uma banda única em gel de agarose, isso foi possível utilizando eletroforese horizontal, onde 15 µL do DNA genômico foram aplicados a cada poço do E-gel® 2% agarose GP (Invitrogen™) e a corrida foi conduzida no sistema E-gel® iBase™ (Invitrogen™), pré-programado para géis de 0,8-2% por 26 minutos, depois de finalizada a corrida os géis foram observados em um transluminador ultravioleta *Gel Documentation System - BL* (Axygen®) e fotografados utilizando o software *Axygen Imaging* (Axygen®).

A verificação da pureza e determinação da concentração do DNA genômico extraído foram realizadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific). Foram consideradas como boas as extrações com pureza  $\geq 1,8$  e  $\leq 2,0$  nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 260nm e 280nm, valores que sugerem um teor baixo de impurezas na amostra (SAMBROOK; RUSSELL, 2001).

### **3.3.2 Eletroforese em gel campo pulsado (PFGE)**

A técnica de PFGE, foi realizada de acordo com o protocolo padronizado para rede PulseNet (CDC PULSENET, 2017; HUNTER et al., 2005).

### 3.3.2.1 Preparo das Amostras

Os isolados de *Salmonella* foram semeados em placas de TSA e incubados em estufa a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas. No dia seguinte, foi selecionada uma colônia e semeada em placa de TSA, com auxílio de suabe onde foi possível obter um crescimento confluyente. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  por 18 horas.

### 3.3.2.2 Crescimento bacteriano e lise celular

As suspensões bacterianas foram preparadas em tampão de suspensão celular (CSB) (Anexo 1) e medidas no espectrofotômetro (Analyser®), utilizando uma densidade ótica (DO) de 0,8 a 1,0 e absorvância de 610 nm. Foram transferidos 300  $\mu\text{L}$  das suspensões celulares a cada microtubo de 1,5 mL, aos quais foram adicionados 15  $\mu\text{L}$  de proteinase K na concentração final de 0,5 mg/mL (Anexo 1). Foram acrescentados 300  $\mu\text{L}$  de agarose Seakem Gold 1% em tampão TEA (Tris-EDTA) (Anexo 1), mantida em banho-maria (DeLeo) a  $50^\circ\text{C}$  -  $55^\circ\text{C}$ , em cada uma das amostras e a mistura foi depositada em moldes reutilizáveis, obtendo-se os *plugs* de gel de agarose. Após solidificação por 15 min em temperatura ambiente, três *plugs* de cada amostra foram dispensados em tubos cônicos de prolipropileno (LSChemicals) (50 mL) contendo 5 mL de solução tampão de lise celular (CLB) (Anexo 1), acrescido de 25  $\mu\text{L}$  de proteinase K para concentração final de 0,1 mg/mL.

A lise do DNA bacteriano foi feita durante 2 horas a  $54^\circ\text{C}$  em incubadora (New Brunswick) com agitação de 150 rpm. Após descartar a solução de lise de cada tubo, duas lavagens com 10-15 mL de água ultrapura estéril pré-aquecida a  $50^\circ\text{C}$  foram feitas por 15 minutos cada lavagem a  $50^\circ\text{C}$  com agitação. Seis lavagens subsequentes dos *plugs*, com

10 mL de tampão TEA pré-aquecido a 50°C, foram realizadas nas mesmas condições descritas acima. Após a última lavagem, foram acrescentados 5 mL de tampão TEA em temperatura ambiente aos *plugs* de agarose que foram mantidos a 4°C até o momento de uso.

### 3.3.2.3 Digestão do DNA

Cada *plug* de agarose contendo o DNA lisado da amostra foi cortado no tamanho de 2 mm de largura e colocados em tubo contendo a solução para digestão enzimática com os seguintes componentes:

Para uma amostra:

- Água estéril qualidade molecular (Promega): 175 µL
- Tampão da enzima (Promega): 20 µL
- BSA 1x (Promega): 2 µL
- Enzima XbaI (Promega) (10U/µL): 3 µL

Volume total por amostra: 200 µL

Em seguida, os tubos com os *plugs* foram incubados em banho-maria a 37°C por 18 horas.

### 3.3.2.4 Gel de eletroforese em campo pulsado

A separação dos fragmentos de DNA foi realizada pela eletroforese em gel de agarose Seakem Gold a 1% em Tris-Borato EDTA (TBE) 0,5X. Como marcador molecular foi utilizado a *S. enterica Braenderup* H9812 (HUNTER et al., 2005). A corrida eletroforética foi realizada no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad Laboratories), com TBE 0,5X a 14°C nos seguintes parâmetros:

- Tempo de pulso inicial: 2.2 segundos
- Tempo de pulso final: 63.8 segundos
- Voltagem: 6V/ Ângulo: 120°
- Tempo de corrida: 18 horas

Após a corrida, o gel foi corado em brometo de etídio por 30 minutos, descorado em água destilada durante 90 minutos, trocando a água a cada 20 minutos e a imagem foi capturada em fotodocumentador (DNR – *Bio imagins systems* – Modelo MiniBis Pro).

### **3.3.2.5 Análise do Perfil Genético**

As imagens foram analisadas no programa BIONUMERICS 8.0 (Applied Maths). O resultado foi gerado pela observação dos fragmentos de restrição, após a corrida eletroforética, comparando o padrão de restrição entre as amostras analisadas. Os dendrogramas para a análise da similaridade genética entre os isolados foram construídos pelo método UPGMA (*Unweighted Pair Group using Mathematical Average Taxonomy*), utilizando-se o coeficiente de Dice, com otimização e tolerância de 1,5%, seguindo as instruções da Rede PulseNet. Para normalização dos géis, o marcador de peso molecular foi disposto em três linhas de cada gel.

### **3.3.3 Sequenciamento do genoma completo**

O sequenciamento do genoma completo foi realizado pelo Laboratório Estratégico do Instituto Adolfo Lutz (LEIAL). As cepas foram sequenciadas na plataforma de sequenciamento MiSeq® (Illumina) a partir do DNA genômico extraído conforme descrito no item 3.3.1, cuja pureza e

concentração inicial foram verificadas em um espectrofotômetro NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) e em um fluorômetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific), respectivamente.

### 3.3.3.1 Diluição do DNA

Após a quantificação com base na dosagem do Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific), o DNA das cepas foi diluído com água destilada ultrapura e livre de DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific) para atingir a concentração de 200 ng em 30 µl de volume final, isso representa a quantidade necessária para realização do WGS, DNA de *input*. As etapas de fragmentação do DNA genômico e preparo das bibliotecas para o sequenciamento foram realizadas utilizando os reagentes e o protocolo do Kit Illumina DNA Prep, enquanto a mistura das bibliotecas e sequenciamento foram realizados utilizando os reagentes e o protocolo do MiSeq Reagent Kit v3 (150 ciclos, 2 X 75-bp paired-end) Illumina.

### 3.3.3.2 Fragmentação do DNA

Esta etapa usa *beads* do tipo *Bead-linked transposomes* (BLT). Durante o processo ocorre à fragmentação do DNA e marcação com adaptadores universais Illumina. Em cada poço de uma placa de 96 poços (Neptune ®) foram adicionados aos 30 µl do DNA genômico diluído de cada uma das cepas, 10 µl da BLT e 10 µl do *Tagmentation Buffer* 1. Essa mistura foi homogeneizada (*up and down*) e a placa foi selada com um adesivo tipo Microseal B. A placa foi então incubada em um termociclador a 55°C por 15 minutos. Imediatamente após o termino, foram adicionados 10µl do *Tagment Stop Buffer* em cada um dos poços e a mistura foi novamente

homogeneizada. A placa foi mais uma vez selada com o adesivo Microseal B, e foi então incubada em um termociclador a 37°C por 15 minutos e mantida a 10°C, até a próxima etapa.

### **3.3.3.3 Lavagem pós-marcação**

Esta etapa lava os adaptadores e reagentes excedentes da etapa anterior, antes da amplificação do DNA. Após a incubação no termociclador a placa foi colocada no suporte magnético por 3 minutos, e então foram realizados três ciclos de lavagem consecutivos: com a placa no suporte magnético foi descartado o sobrenadante, adicionado 100 µL de *Tagment Wash Buffer* a cada poço da placa de 96 poços, foi removido a placa do suporte magnético, homogeneizada (*up and down*) e retornado a placa no suporte magnético por mais 3 minutos, esse processo se repetiu três vezes sendo que ao final da terceira lavagem foi mantida a placa no suporte magnético descartando o sobrenadante para a próxima etapa.

### **3.3.3.4 Amplificação do DNA marcado**

Esta etapa amplifica o DNA marcado usando programa de *polymerase chain reaction* (PCR) ciclo limitante, completando os adaptadores com os index 1 (i7) e index 2 (i5), necessários para a geração de *clusters* no sequenciamento e identificação única para cada cepa. Em cada um dos poços da placa foram adicionados 5 µl do index 1 (i7), 5 µl do index 2 (i5) para cada cepa, 20 µl do *Enhanced PCR Mix* e 20 µl de água destilada ultrapura e livre de DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific). As misturas nos poços foram homogeneizadas (*up and down*) e a placa foi selada com adesivo o Microseal B, sendo em seguida levada para



amplificação em um termociclador sob as seguintes condições: 1 ciclo de 68° C por 3 minutos; 1 ciclo de 98° C por 3 minutos; 5 ciclos de: 98° C por 45 segundos, 62° C por 30 segundos, 68° C por 2 minutos; seguidos de uma etapa de extensão final de 1 ciclo de 68° C por 1 minuto e sendo mantida ao final a 10°C.

### 3.3.3.5 Purificação das bibliotecas

Esse processo de purificação utiliza em duas etapas *beads* magnéticas para selecionar a faixa de tamanho em pares de base (pb) da biblioteca de interesse. Após a amplificação, a placa foi centrifugada por 1 minuto a 280 xg a 20°C, depois foi colocada no suporte magnético por 5 minutos, após esse período uma alíquota de 45 µl da mistura de cada poço foi transferida para uma nova placa *deepwell*. Em cada um dos poços da *deepwell* foram adicionados 40 µl de água destilada ultrapura e livre de DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific) e 45 µl do *Sample Purification Beads*, em seguida, a mistura foi homogeneizada (*up and down*) e então mantida em temperatura ambiente por 5 minutos, foi então colocada em uma estante magnética novamente por 5 minutos até que o sobrenadante das misturas se tornasse límpido.

Na sequência 125 µL desse sobrenadante foi transferido para uma coluna da placa *deepwell* que ainda não foi utilizada, a placa foi então retirada do suporte magnético, foram adicionados 15 µL do *Sample Purification Beads* a mistura transferida e homogeneizada (*up and down*), então mantida em temperatura ambiente por 5 minutos, foi colocada novamente em uma estante magnética por 5 minutos até que o sobrenadante das misturas se tornasse límpido, com a placa *deepwell* no suporte magnético, foi descartado aproximadamente 140 µl do sobrenadante.

Posteriormente, foram realizadas 2 lavagens compostas da adição de 200 µl de etanol 80% em cada poço e do descarte do sobrenadante formado logo após 30 segundos. Após esta etapa, a placa foi mantida por 5 minutos na estante magnética para a secagem completa do etanol e logo depois foram adicionados 32 µl do *Resuspension Buffer* em cada poço. Em seguida, a placa *deepwell* foi retirada do suporte magnético e a mistura foi homogeneizada (*up and down*) e então mantida em temperatura ambiente por 2 minutos. Foi então colocada novamente na estante magnética por 2 minutos até que o sobrenadante das misturas se tornasse límpido, onde foram retiradas alíquotas de 15 a 20µl deste sobrenadante para cada biblioteca das cepas estudadas.

### **3.3.3.6 Quantificação e normalização das bibliotecas**

Todas as bibliotecas foram dosadas utilizando o fluorômetro Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific), e o tamanho de fragmentos das bibliotecas foi avaliado através do sistema de eletroforese capilar contando a média de tamanho dos fragmentos majoritários em pb pelo sistema Qsep1 (Bioptic Inc.). A concentração em ng/µL obtido no Qubit e a média de tamanho dos fragmentos majoritários em pb obtidos no Qsep1 foram utilizados para realizar a conversão de molaridade das bibliotecas em nM, usando a seguinte fórmula:  $nM = ([ng/uL] \times 10^6) / (660 \times \text{média do tamanho dos fragmentos em pb})$ .

### **3.3.3.7 Mistura das bibliotecas, normalização e carregamento**

Antes de prosseguir às bibliotecas, o *Reagent cartridge*, o cartucho que contém os reagentes necessários para a realização do sequenciamento

e que é armazenado a -20°C foi descongelado em temperatura ambiente até que os poços contendo os reagentes líquidos estivessem totalmente descongelados. Após o descongelamento, o cartucho foi seco e visualmente inspecionado para verificar quaisquer alterações visuais em seus reagentes.

Todas as bibliotecas foram normalizadas para uma concentração de 8 nM antes do preparo do pool afim de deixar equimolar todos os isolados, amenizando diferenças de clusterização durante a etapa inicial do sequenciamento. Em um tubo DNA LoBind® (Eppendorf™), foi feito então um pool contendo 5 µl de cada uma das bibliotecas obtidas com uma concentração de 8 nM cada. Após ser homogeneizado, o pool foi diluído para uma concentração de 4 nM utilizando *Resuspension Buffer* como diluente, foi utilizando o cálculo de concentração:  $C_i.V_i = C_f.V_f$ , considerando a  $C_i$  obtido através da dosagem do pool no Qubit e valor de  $C_f$  de 4 nM e  $V_f$  desejado de 10 µL.

Para desnaturação do pool, uma alíquota de 5 µl desta diluição foi transferida para um novo tubo DNA LoBind® (Eppendorf™), onde foram adicionados 5 µl do NaOH a 0,2 N (Anexo 1) em temperatura ambiente diluídos no momento do uso, foi homogeneizado (*up and down*) e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado 990 µL do *Hybridization Buffer* resfriado para o tubo do pool desnaturado, resultando em 1 mL de pool desnaturado a 20 pM, a concentração adotada para carregamento do cartucho foi de 15 pM, e para isso o pool a 20 pM foi diluído usando 450 µL do pool a 20 pM e 150 µL de *Hybridization Buffer*. Por último, 600 µl deste pool foram adicionados no cartucho, que foi levado para a realização do sequenciamento no equipamento MiSeq® (Illumina).

### 3.4 ANÁLISES GENÔMICAS PELO SEQUENCIAMENTO DO GENOMA COMPLETO

#### 3.4.1 Análise dos dados obtidos através do WGS

Ao finalizar a corrida, a montagem dos genomas foi realizada a partir dos arquivos fastq obtidos pelo sequenciamento de *short reads* utilizando o software CLC *Genomics Workbench* 9.5.3 ([www.digitalinsights.qiagen.com/](http://www.digitalinsights.qiagen.com/)). A anotação dos *contigs* foi realizada via plataforma UseGalaxy – Prokka (CUCCURU et al., 2014; SEEMANN, 2014). Os *contigs* obtidos nas montagens foram utilizados na pesquisa de genes de virulência, genes de resistência a antimicrobianos e nas análises de SNPs, MLST, cgMLST, *PlasmidFinder* e pMLST. A identificação taxonômica molecular do sorotipo dos isolados de *Salmonella* foi realizada utilizando dados brutos de sequenciamento (*short reads*) fastQ contra a database do *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) - SeqSero 1.2 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SeqSero/>) (ZHANG et al., 2015).

#### 3.4.2 Pesquisa de genes de virulência

A pesquisa dos genes de virulência foi realizada para todas as 32 cepas de *S. Heidelberg* estudadas através dos *contigs* gerados pelo WGS, utilizando a ferramenta online VFDB (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>) (LIU et al., 2019). Os seguintes genes foram pesquisados utilizando essa ferramenta:

Adesão

- Agf (fímbrias agregativas finas, ou curli), genes relacionados: *csgA*; *csgB*; *csgC*; *csgD*, *csgE*; *csgF* e *csgG*

- Lpf (fímbrias polares longas), genes relacionados: *lpfA*; *lpfB*; *lpfC*; *lpfD* e *lpfE*
- MisL, gene relacionado: *misL*
- Pef (fímbrias codificadas por plasmídeo): genes relacionados: *pefA*; *pefB*; *pefC* e *pefD*
- RatB, gene relacionado: *ratB*
- ShdA, gene relacionado: *shdA*
- SinH, gene relacionado: *sinH*
- Fímbria tipo 1, genes relacionados: *fimA*; *fimC*; *fimD*; *fimF*; *fimH*; *fimI*; *fimW*; *fimY* e *fimZ*

#### Captação de magnésio

- MgtBC, genes relacionados: *mgtB* e *mgtC*

#### Regulação

- PhoPQ, genes relacionados: *phoP* e *phoQ*

#### Resistência a peptídeos antimicrobianos

- Mig-14 (gene induzível por macrófago-14), gene relacionado: *mig-14*

#### Resistência sérica

- Rck (resistência à morte por complemento), gene relacionado: *rck*

#### Proteína de estresse

- SodCI, gene relacionado: *sodCI*

Foi também utilizado a ferramenta online CGE - MyDbFinder 2.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/MyDbFinder/>) para pesquisa dos genes de virulência *invA*, *sifA*, *sopB*, *sopE2*, *sipA*, *ssaR*, *sopD*, *sipD*, *flgK*, *fljB* e *flgL*. O MyDbFinder identifica genes do banco de dados criado pelo usuário, nas cepas das bactérias sequenciadas. Para a construção do banco de dados utilizado, inicialmente foi criado um banco personalizado com *software* Bloco de Notas (Microsoft) na extensão .txt, contendo as sequências de nucleotídeos dos 12 genes a serem pesquisados, em formato fasta. Para isso, na primeira linha do arquivo foi adicionada a identificação da sequência

(Exemplo: >Seq1\_nomedogene1) e na segunda linha a sequência de nucleotídeos do respectivo gene, repetindo este processo para cada linha com os demais genes. Essas sequências foram obtidas no genoma de referência da cepa de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium str. LT2 disponível no GenBank (número de acesso NC\_003197.2).

Cada uma das montagens dos genomas das cepas do estudo foi individualmente submetida na plataforma junto do banco de dados criado para realizar a pesquisa desses 11 genes selecionados separadamente, utilizando como parâmetros mínimos para a confirmação da presença de um gene uma similaridade de 95% e cobertura de 80%.

### **3.4.3 Pesquisa de genes de resistência a antimicrobianos**

A busca pelos genes de resistência antimicrobianos foi realizada através dos *contigs* gerados pelo WGS utilizando a ferramenta online ResFinder 4.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/ResFinder/>) (BORTOLAIA et al., 2020).

Todos os *contigs* das cepas de *S. Heidelberg* foram individualmente submetidos na plataforma, na qual foram detectados genes adquiridos de resistência de diferentes classes de agentes antimicrobianos como:  $\beta$ -lactâmicos; Aminoglicosídeos; Tetraciclina; Quinolonas; Sulfonamida; Fenicolis. Foram também pesquisadas mutações nos genes cromossômicos *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, capazes de conferir resistência a quinolonas.

Para realização da pesquisa desses genes e mutações, foi utilizado um filtro para o gênero *Salmonella* spp. onde foram selecionados como parâmetros mínimos cobertura de 80% e uma similaridade de 95% para a confirmação da presença destes genes.

#### 3.4.4 Detecção e tipagem *in silico* de plasmídeos

Para detecção e caracterização *in silico* de plasmídeos das sequências de WGS do estudo, foi utilizado a ferramenta *online PlasmidFinder* e pMLST (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) (<https://cge.food.dtu.dk/services/pMLST/>) (CARATTOLI et al., 2014).

Essas ferramentas facilitam a tipagem bacteriana com base em genomas de *Enterobacteriaceae* por uma rápida detecção de diversos tipos de plasmídeos conhecidos. Essa ferramenta utiliza um banco de dados que foi construído a partir de 559 sequências de plasmídeos totalmente sequenciados que foram coletadas no banco de dados de nucleotídeos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) associados à família *Enterobacteriaceae*. O *PlasmidFinder* é útil para análise de sequências de plasmídeo a partir de dados brutos como os de fastq gerados pelo WGS, atualmente ele contém em seu banco de dados 116 sequências de plasmídeo que correspondem a pelo menos 80% de identidade de nucleotídeo com todas as sequências de plasmídeo identificadas nos 559 plasmídeos totalmente sequenciados coletados no NCBI (CARATTOLI et al., 2014).

Já para a análise de pMLST, um banco de dados atualizado semanalmente foi gerado em [www.pubmlst.org](http://www.pubmlst.org) e integrado em uma ferramenta da web chamada pMLST que foi utilizado pelo presente estudo para identificar os STs de plasmídeo conhecidos presentes nas cepas de *S. Heidelberg* (CARATTOLI et al., 2014).

## 3.5 ANÁLISES FILOGENÉTICAS

### 3.5.1 *Multilocus sequence typing (MLST)*

A metodologia de MLST foi realizada para todos as cepas de *S. Heidelberg* estudados utilizando os *contigs* gerados pelo WGS. A ferramenta online *CGE - MLST 2.0* (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>) (LARSEN et al., 2012) foi utilizada. Cada cepa de *S. Heidelberg* foi individualmente submetida na plataforma, e foi realizada a pesquisa dos sete genes conservados (*housekeeping*) *aroC*, *dnaN*, *hemC*, *hisD*, *purE*, *sucA* e *thrA*, os quais resultam em um sequenciotipo (ACHTMAN et al., 2012).

### 3.5.2 *Análise de single-nucleotide polymorphism (SNP)*

A análise de SNPs foi realizada através da ferramenta online *CSI Phylogeny 1.4 (Call SNPs & Infer Phylogeny)* (<https://cge.food.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>) utilizando os *contigs* gerados pelo WGS (KAAS et al., 2014).

Inicialmente, todos os *contigs* foram submetidos simultaneamente na plataforma para a análise, assim como um isolado *Salmonella Heidelberg* para o campo específico de genoma a ser utilizado como referência. Os parâmetros para a pesquisa de SNPs foram os padrões utilizados pela ferramenta (KAAS et al., 2014).

Ao final da análise, os resultados obtidos no *CSI Phylogeny* foram visualizados na ferramenta online *Microreact*. Um banco de metadados foi construído utilizando um arquivo de extensão *.csv* contendo todas as informações referentes à identificação dos isolados, origem, procedência e genes de resistência a antimicrobianos (ARGIMÓN et al., 2016).



### 3.5.3 Core genome MLST (cgMLST)

A análise de cgMLST foi realizada para as 32 cepas de *S. Heidelberg* estudadas através dos *contigs* gerados pelo sequenciamento, utilizando o *software* BIONUMERICS 8.0 (Applied Maths). A comparação foi realizada utilizando o pipeline de análise e o banco de dados do Enterobase que verifica um conjunto de *loci*, de 3002 genes, fornecendo uma alta resolução dos genes centrais (ENTEROBASE, 2021). O PulseNet preconiza que isolados com até 10 alelos de diferença tem maior probabilidade de estarem relacionados. Também foi realizada uma árvore de extensão mínima (*minimum spanning tree*) utilizando o mesmo *software* comparando a similaridade genotípica a partir de 64 cepas coletadas do banco de dados Enterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/species/senterica>) realizada em comparação com os *contigs* das 32 cepas de *S. Heidelberg* estudadas. Os *contigs* selecionados dessas cepas foram confirmados quanto ao sorotipo Heidelberg utilizando a ferramenta online *Pathogenwatch* (<https://pathogen.watch/>). O anexo 3 contém uma tabela com todas as informações relacionadas as cepas selecionadas do banco Enterobase.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Das 32 cepas de *S. Heidelberg*, 30 (93,8%) apresentaram resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos, enquanto duas (6,3%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados, 26 cepas (81,3%) apresentaram resistência a três ou mais diferentes classes de antimicrobianos, sendo classificados como multi-resistentes. A Tabela 3 apresenta as porcentagens de isolados resistentes ou que apresentaram perfis de resistência intermediário aos 19 antimicrobianos testados.

Tabela 3 - Número e porcentagem de isolados resistentes e que apresentaram perfis intermediário de resistência entre os 32 isolados estudados de *Salmonella Heidelberg*

Antimicrobianos	Nº Isolados resistentes (%)	Nº Isolados com perfil intermediário (%)
<b>Penicilinas</b>		
Ampicilina	21 (65,6%)	1 (3,1%)
<b>Associações de <math>\beta</math>-lactâmicos e inibidores de <math>\beta</math>-lactamases</b>		
Amoxicilina - ácido clavulânico	19 (59,4%)	1 (3,1%)
<b>Cefalosporinas</b>		
Cefoxitina	19 (59,4%)	0
Cefotaxima	20 (62,5%)	0
Ceftriaxona	16 (50%)	3 (9,4%)
Ceftazidima	19 (59,4%)	1 (3,1%)
Cefepime	0	1 (3,1%)
<b>Monobactâmicos</b>		
Aztreonam	0	6 (18,8%)
<b>Carbapenêmicos</b>		
Imipenem	0	0
<b>Aminoglicosídeos</b>		
Gentamicina	4 (12,5%)	0
Amicacina	0	0

Estreptomicina	9 (28,1%)	13 (40,6%)
<b>Tetraciclina</b>		
Tetraciclina	25 (78,1%)	1 (3,1%)
<b>Quinolonas e Fluorquinolonas</b>		
Ciprofloxacina	1 (3,1%)	3 (9,4%)
Ácido nalidíxico	29 (90,6%)	0
Pefloxacina	28 (87,5%)	0
<b>Sulfonamidas</b>		
Sulfametoxazol-trimetoprima	0	0
Sulfonamida	25 (78,1%)	1 (3,1%)
<b>Anfenicóis</b>		
Cloranfenicol	0	0

Em relação ao teste de concentração inibitória mínima (CIM) para fluorquinolonas, 28 cepas (87,5%) foram sensíveis, três (9,4%) apresentaram perfil intermediário de resistência, destas apenas a cepa 306\_14 (suabe de arrasto) apresentou o gene *qnrB19*. Uma cepa (3,1%) foi resistente para ciprofloxacina (CIM>1µg/mL) e está cepa 443\_12 (humano) apresentou o gene *qnrB19*. As 29 cepas (90,6%) apresentaram perfil de resistência ao ácido nalidíxico (CIM>256 µg /mL).

O anexo 2 descreve os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos das 32 cepas estudadas de S. Heidelberg.

## 4.2 PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)

A Figura 1 representa uma eletroforese em campo pulsado em gel de agarose PFGE 1% após clivagem do DNA genômico com a enzima de restrição *XbaI* após corrida e já corada em brometo de etídio, para visualização dos fragmentos de restrição gerados pelo ensaio de PFGE para algumas das cepas de S. Heidelberg analisadas.

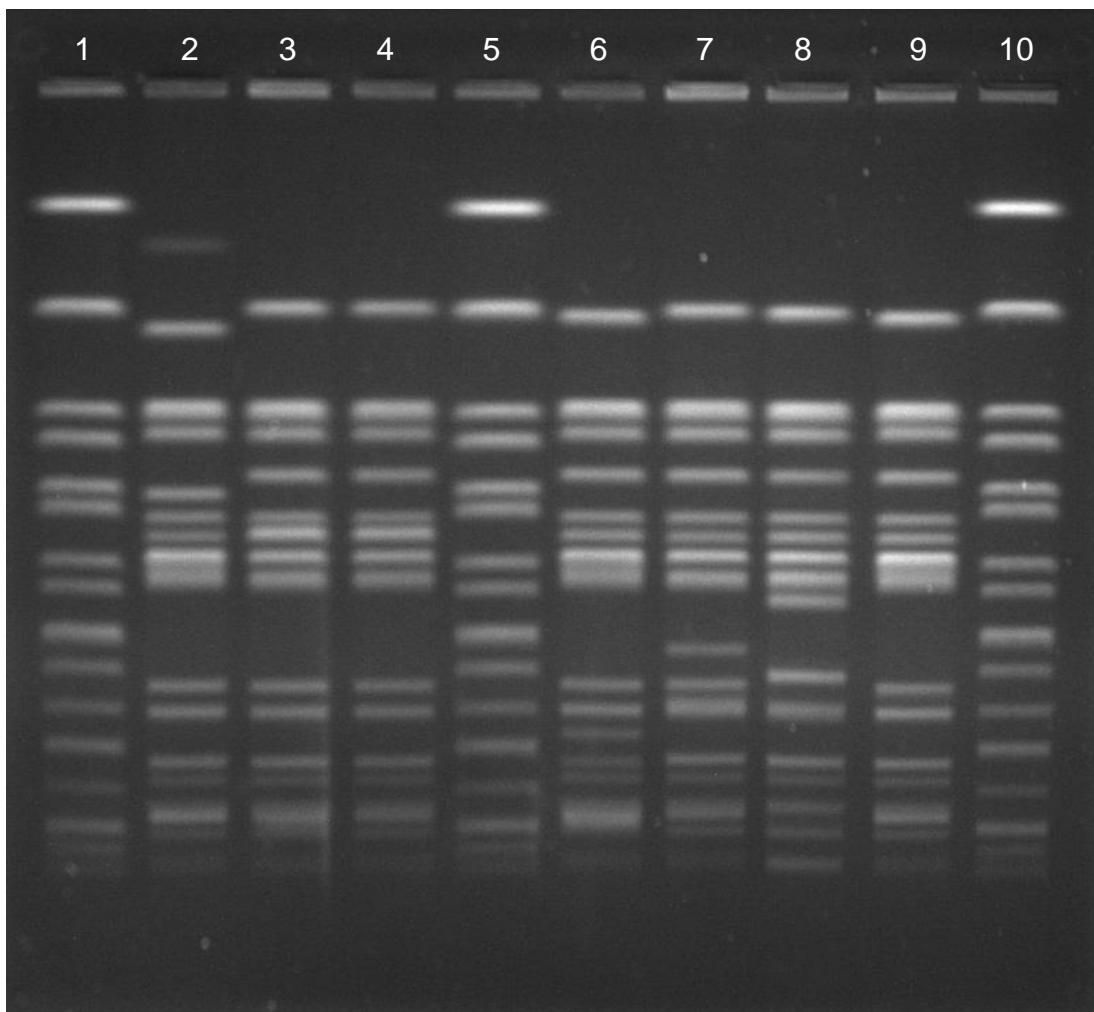


Figura 1 - Gel de agarose 1%, representativo do ensaio de PFGE das cepas de *Salmonella* Heidelberg, clivadas com a enzima *XbaI*

Canaletas 1, 5, 10: *S. Braenderup* H9812 (marcador de peso molecular). Canaletas de 2 a 4: cepas 163\_15, 29\_16 e 149\_16. canaletas de 6 a 9: cepas: 148\_17, 7\_20, 140\_20 e 74\_20.

A Figura 2 apresenta o dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da metodologia de PFGE para as cepas de *S. Heidelberg*. A macro-restrição do DNA cromossômico, obtida com a enzima *XbaI* apresentou 80,4% de similaridade e agrupou as cepas estudadas em 21 pulso-tipos diferentes. A porcentagem de similaridade entre as cepas foi obtida pela análise do dendrograma com o coeficiente de Dice e o UPGMA com 1,5% de otimização e 1,5% de limite de tolerância.

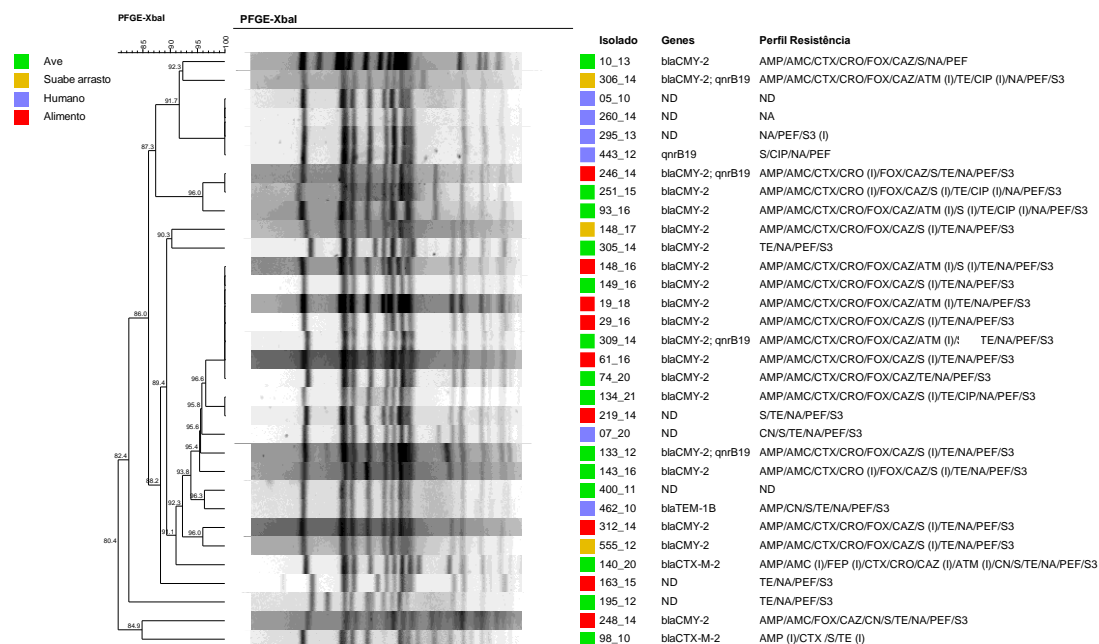


Figura 2 - Dendrograma obtido pela análise dos perfis de PFGE após digestão com *XbaI* das cepas de *Salmonella* Heidelberg. Foi utilizado o coeficiente de Dice com tolerância e otimização de 1,5% e UPGMA (Bionumerics 7.8). Estão indicados: sítio de origem, número da amostra\_ano, genes de resistência e o perfil de resistência fenotípica para as 32 cepas estudadas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>AMP, Ampicilina; AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; FOX, Cefoxitina; CTX, Cefotaxima; CRO, Ceftriaxona; CAZ, Ceftazidima; FEP, Cefepime; ATM, Aztreonam; IPM, Imipenem; CN, Gentamicina; AK, Amicacina; S, Estreptomicina; TE, Tetraciclina; CIP, Ciprofloxacina; NA, Ácido nalidíxico; PEF, Pefloxacina; SXT - Sulfametoxazol-trimetoprima; S3, Sulfonamida; C, Cloranfenicol; ND, não detectado.

### 4.3 EXTRAÇÃO E VERIFICAÇÃO DA PUREZA E INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO

Todos as 32 cepas tiveram seu DNA genômico extraído e apresentaram pureza entre 1,8 e 2,0. A figura 4 apresenta um gel representativo de uma eletroforese em E-gel® 2% agarose GP (Invitrogen™), realizada para avaliação da integridade do DNA genômico de alguns dos isolados de *S. Heidelberg* estudadas.

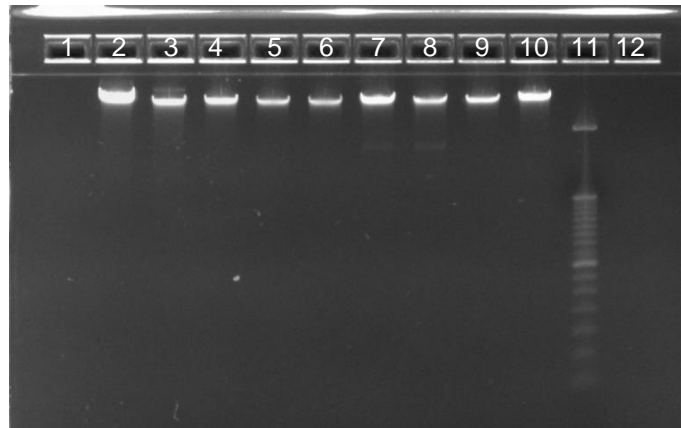


Figura 3 - E-gel® 2% agarose GP (Invitrogen™) representando o produto da extração do DNA genômico de algumas cepas de *S. Heidelberg* estudadas

Canaleta 1: H<sub>2</sub>O. Canaletas de 2 a 10: cepas *S. Heidelberg* respectivamente; 143\_16, 148\_16, 149\_16, 148\_17, 019\_18, 007\_20, 074\_20, 140\_20, 134\_21. Canaleta 11: marcador de peso molecular GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific)

#### 4.4 PESQUISA DE FATORES DE VIRULÊNCIA

Os dados obtidos no sequenciamento de genoma completo utilizando a plataforma MiSeq (Illumina) foram utilizados para a pesquisa de fatores de virulência, utilizando a ferramenta online VFDB. Todas as cepas estudadas apresentaram os fatores de virulência Lpf, MisL, RatB, ShdA e SinH, associados a adesão bacteriana. O fator de virulência Pef não foi detectado em nenhuma das cepas estudadas. Com relação ao fator Agf, em 18 (56,3%) genomas foram encontrados todos os genes relacionados, enquanto em 14 (43,8%) identificou-se apenas parte desses genes. Para fímbrias tipo 1, em 21 (65,6%) cepas foram encontrados todos os genes do operon, enquanto em 11 (34,4%) genomas o mesmo estava incompleto.

O fator MgtBC, que está associado à captação de magnésio, foi detectado em todas as cepas estudadas. O fator PhoPQ, relacionado ao

controle a expressão de mais de 40 genes, também foi positivo para todas as cepas.

Em relação aos fatores que promovem atividade antimicrobiana e vantagem competitiva, o fator Mig-14 foi detectado em todas as cepas. O fator de virulência que promove resistência sérica Rck não foi detectado em nenhuma cepa. O fator de virulência SodCI que contribui para a sobrevivência da bactéria durante a fase sistêmica da infecção, foi detectado apenas no isolado 140\_20.

Dentre os 11 genes de virulência, os genes *invA*, *sifA*, *sopB*, *sopE2*, *ssaR*, *sopD*, *flgK*, *fljB* e *flgL* foram detectados em todas as cepas estudadas, de acordo com os parâmetros descritos no item 3.3.4. Os genes *sipA*, *sipD* foram detectados em quase todas as cepas com exceção dos isolados 148\_17 (suabe de arrasto) e 074\_20 (ave).

Tabela 4 - Perfil genotípico de virulência dos 32 isolados estudados de S. Heidelberg

	Fim-1(9)	Pei(4)	Lpf(5)	Agf(7)	ShoA	MsL	SinH	RatB	invA	PhoPQ(2)	Mig-14	MgBC(2)	sopB	sifA	sopE2	sipA	ssaR	sopD	flgK	fljB	flgL	Rck	SodCI	sipD
005_10	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
098_10	1	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
462_10	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
400_11	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
133_12	1	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
195_12	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
443_12	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
555_12	7	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
010_13	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
295_13	7	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
219_14	8	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
246_14	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
248_14	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
260_14	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
305_14	8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
306_14	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
309_14	1	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
312_14	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
163_15	7	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
251_15	7	0	1	4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
029_16	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
061_16	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
093_16	1	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
143_16	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
148_16	1	0	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
149_16	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
148_17	8	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
019_18	8	0	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
007_20	7	0	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
074_20	7	0	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0
140_20	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
134_21	5	0	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1

A Tabela 4 contém um resumo com todos os fatores de virulência pesquisados, cada linha representa uma cepa e cada coluna um fator de virulência. Em verde temos a presença do gene, em vermelho a ausência e em amarelo a indicação de quantos genes foram encontrados em relação ao determinado operon.

#### 4.5 PESQUISA DE GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Foram detectados os genes *bla*<sub>CMY-2</sub> em 20 cepas (62,5%), o gene *bla*<sub>CTX-M-2</sub> em duas cepas (6,3%) e o gene *bla*<sub>TEM-1B</sub> em uma cepa (3,1%), os quais conferem resistência a antimicrobianos da classe dos β-lactâmicos. Os genes de resistência à classe dos aminoglicosídeos detectados foram: *aac*(3)-*Via* (n=3/9,4%) *aac*(6')-*Iaa* (n=32/100%), *aadA1* (n=4/ 12,5%), *aph*(6)-*Id* (n=1/ 3,1%) e *aph*(3'')-*Ib* (n=1/ 3,1%), enquanto 25 cepas foram positivas para o gene *tet*(A) (78,1%), que confere resistência a antimicrobianos da classe das tetraciclina.

Em relação à resistência a quinolonas, foram detectadas mutações em genes cromossômicos. Foram encontrados dois tipos de mutações no gene *parC* e três tipos no gene *gyrA*.

A respeito das mutações em *gyrA*, foi encontrada a mutação pontual *gyrA* (p.S83F) (PMID: 7492118, 10471553) da base TCC para TTC no códon que codifica o aminoácido Serina (S), leva à formação do aminoácido Fenilalanina (F). A mutação pontual *gyrA* (p.A119E) (PMID: 12409384) troca da base GCA para GAA no códon que codifica o aminoácido Alanina (A), leva à formação do aminoácido Glutamato (E). Finalmente, a mutação pontual *gyrA* (p.D87G) (PMID: 10471553, 11283069, 7492118, 15056435) com a troca da base GAC para GGC no códon que codifica o aminoácido Aspartato (D), leva à formação do aminoácido Glicina (G).

Já no gene *parC* foram detectadas duas mutações pontuais, a mutação *parC* (p.T57S) (PMID: 15388468) realiza a troca da base ACC para AGC no códon que codifica o aminoácido Treonina (T), levando a formação do aminoácido Serina (S), enquanto em uma segunda mutação pontual *parC* (p.S80R) (PMID: 15388468, 15388468) ocorre a troca da base AGC para AGA no códon que codifica a formação do aminoácido Serina (S), levando a formação de uma Arginina (R).

Dentre as cepas estudadas, 26 (81,3%) apresentaram a mutação pontual em *gyrA* (p.S83F), enquanto 30 (93,8%) possuíam a mutação *parC*



(p.T57S). As cepas 443\_12, 295\_13 e 260\_14 apresentaram mutações pontuais nos genes *gyrA* (p.A119E), *gyrA* (p.D87G), *parC* (p.S80R) e *parC* (p.T57S). A cepa 400\_11 apresentou mutação pontual apenas no gene *parC* (p.T57S). Todas essas mutações são consideradas clássicas e já foram descritas na literatura sob o número descrito pelo PMID, elas já se demonstraram relevantes para a função da proteína. Em nosso estudo todas as mutações batem com o fenótipo gerando resistência à NA com exceção da mutação *parC* (p.T57S) na cepa 400\_11.

Em relação à resistência a fluorquinolonas mediadas por plasmídeo, foi detectado apenas o gene *qnrB19* em cinco cepas (15,6%) de *S. Heidelberg*. Já com relação aos genes relacionados à resistência a sulfonamidas, foram detectados *sul1* (n=4/12,5%) e *sul2* (n=25/78,1%).

Tabela 5 - Número e porcentagem de isolados que apresentaram genes de resistência a antimicrobianos ou mutação em genes cromossômicos

<b>Gene de resistência a antimicrobiano ou mutação</b>	<b>N° isolados resistentes (%)</b>
<b>β-lactâmicos</b>	
<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	20 (62,5%)
<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	2 (6,3%)
<b>Aminoglicosídeos</b>	
<i>aac(3)-Via</i>	3 (9,4%)
<i>aac(6')-Iaa</i>	32 (100%)
<i>aadA1</i>	4 (12,5%)
<i>aph(6)-Id</i>	1 (3,1%)
<i>aph(3'')-Ib</i>	1 (3,1%)
<b>Tetraciclina</b>	
<i>tet(A)</i>	25 (78,1%)
<b>Quinolonas</b>	
<i>gyrA</i> (p.S83F)	26 (81,3%)
<i>gyrA</i> (p.A119E)	3 (9,4%)
<i>gyrA</i> (p.D87G)	3 (9,4%)
<i>parC</i> (p.T57S)	30 (93,8%)
<i>parC</i> (p.S80R)	3 (9,4%)
<i>qnrB19</i>	5 (15,6%)
<b>Sulfonamida</b>	
<i>sul1</i>	4 (12,5%)
<i>sul2</i>	25 (78,1%)

No anexo 2 estão apresentados os perfis genotípicos de resistência a antimicrobianos das 32 cepas estudadas de *S. Heidelberg*.

A Tabela 6 mostra as substituições de aminoácidos em *gyrA* e *parC* das 30 cepas que foram detectadas mutações de *S. Heidelberg*.

Tabela 6 - Substituições de aminoácidos em *gyrA* e *parC* das 30 cepas que foram detectadas mutações de *S. Heidelberg*

Isolado	Ano	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	Sítio de Origem
462/10	2010	S83F	T57S	Humano
400/11	2011	-	T57S	Ave
133/12	2012	S83F	T57S	Ave
195/12	2012	S83F	T57S	Ave
443/12	2012	A119E, D87G	T57S, S80R	Humano
555/12	2012	S83F	T57S	Ambiente
010/13	2013	S83F	T57S	Ave
295/13	2013	A119E, D87G	T57S, S80R	Humano
219/14	2014	S83F	T57S	Alimento
246/14	2014	S83F	T57S	Alimento
248/14	2014	S83F	T57S	Alimento
260/14	2014	A119E, D87G	T57S, S80R	Humano
305/14	2014	S83F	T57S	Ave
306/14	2014	S83F	T57S	Ambiente
309/14	2014	S83F	T57S	Ave
312/14	2014	S83F	T57S	Alimento
163/15	2015	S83F	T57S	Alimento
251/15	2015	S83F	T57S	Ave
029/16	2016	S83F	T57S	Alimento
061/16	2016	S83F	T57S	Alimento
093/16	2016	S83F	T57S	Ave
143/16	2016	S83F	T57S	Ave
148/16	2016	S83F	T57S	Alimento
149/16	2016	S83F	T57S	Ave
148/17	2017	S83F	T57S	Ambiente
019/18	2018	S83F	T57S	Alimento
007/20	2020	S83F	T57S	Humano
074/20	2020	S83F	T57S	Ave
140/20	2020	S83F	T57S	Ave

#### 4.6 DETECÇÃO E TIPAGEM *IN SILICO* DE PLASMÍDEOS

A caracterização *in silico* de plasmídeos utilizando a ferramenta PlasmidFinder (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>), nas sequências obtidas pelo WGS demonstraram a presença dos seguintes plasmídeos nos isolados estudados: Col(pHAD28) (n=11/34,4%), Col156 (n=1/3,1%), ColpVC (n=25/78,1%), IncHI2 (n=2/6,3%), IncX1 (n=26/81,3%), IncC (n=24/75%), IncI1 (n=18/56,3%), pEC4115 (n=2/6,3%) e IncFII(S) (n=1/3,1%). Apenas três isolados 005\_10, 295\_13, 260\_14 não tiveram plasmídeos detectados *in silico*, e estes apresentaram apenas o gene de virulência *aac(6')-laa*, e mutações em *gyrA* e *parC*. Na Tabela 7 estão descritos os resultados do pMLST, ferramenta que permitiu identificar os STs apenas dos plasmídeos IncHI2, IncC, IncI1 e IncFII(S). A tabela mostra o número total e a porcentagem dos respectivos STs de cada plasmídeo. No momento da análise não havia esquema pMLST para IncX.

Tabela 7 - Número e porcentagem de isolados que apresentaram plasmídeos e seus respectivos *Sequence Types*

Plasmídeo	<i>Sequence Type</i> (ST)
IncHI2 (n=2/6,3%)	ST4 (n=1/50%), ST3 (n=1/50%)
IncC (n=24/75%)	ST2 (n=24/100%)
IncI1 (n=18/56,3%)	ST12 (n=17/94,4%), ST113 (n=1/5,6%)
IncFII(S) (n=1/3,1%)	ST[S3:A-B-] (n=1/100%)

Na Figura 4 temos um perfil esquemático, mostrando os plasmídeos detectados entre as cepas estudadas. Em destaque temos os plasmídeos IncI1 e IncC que estão associados na literatura ao gene de resistência *bla<sub>CMY-2</sub>*.

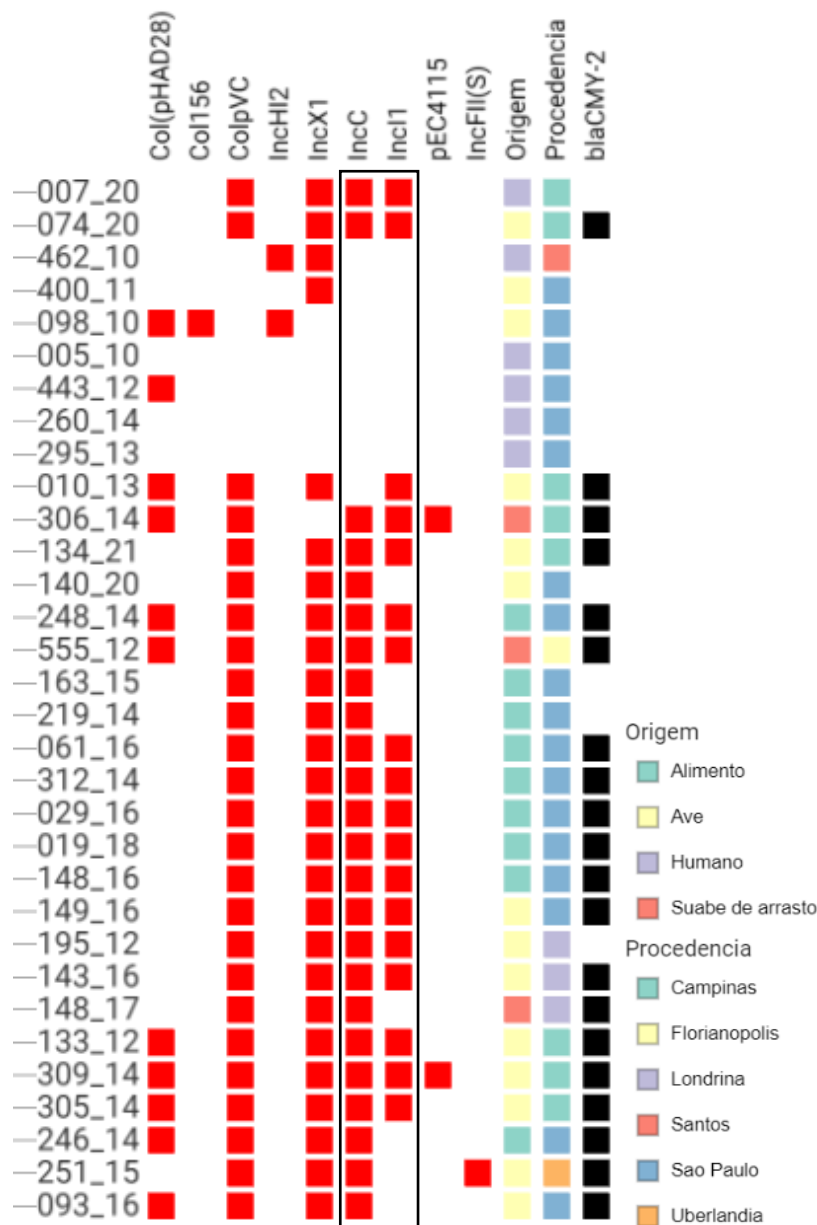


Figura 4 - Perfil esquemático construído utilizando a aplicação web *Microreact* indicando em vermelho os respectivos plasmídeos detectados, em preto o gene *bla<sub>CMY-2</sub>*. Origem e procedência indicadas de acordo com a legenda, para as 32 cepas de *Salmonella Heidelberg* estudados

Dentre as cepas que não apresentaram nenhum perfil de resistência fenotípica aos antimicrobianos testados (n=2), na cepa 400\_11 foi detectado o plasmídeo IncX1, contendo também o gene de resistência *aac(6')-laa* e a detecção da mutação no gene *parC*, e na cepa 005\_10 não foi detectado nenhum tipo de plasmídeo, apenas o gene de resistência *aac(6')-laa*.

Em relação às cepas de origem humana (n=6) foram detectados os plasmídeos Col(pHAD28) (n=1), ColpVC (n=1), IncHI2 (n=1), IncX1 (n=2), IncC (n=1), IncI1 (n=1), sendo que os isolados 260\_144 e 295\_13 não apresentaram plasmídeo. Não foi encontrado o gene *bla<sub>CMY-2</sub>* em cepas de origem humana. Entre as cepas de ave (n=14) houve a detecção dos plasmídeos Col(pHAD28) (n=6), Col156 (n=1), ColpVC (n=12), IncHI2 (n=1), IncX1 (n=13), IncC (n=11), IncI1 (n=9), pEC4115 (n=1) e IncFII (n=1).

#### 4.7 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

As 32 cepas de *S. Heidelberg* analisados pela metodologia de MLST apresentaram o mesmo *sequence type*, ST15 obtidos com base na pesquisa dos sete genes *housekeeping aroC, dnaN, hemC, hisD, purE, sucA e thrA*.

#### 4.8 ANÁLISE DE SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS (SNPS)

A **Erro! Fonte de referência não encontrada.** representa o dendrograma de similaridade genotípica gerado a partir da análise de SNPs realizada com os *contigs* das 32 cepas de *S. Heidelberg* estudadas. Os resultados da análise de SNPs revelaram uma diferença mínima de 15 SNPs e máxima de 157 SNPs. O dendrograma de similaridade genotípica demonstrou uma alta similaridade entre os isolados estudados que foram agrupados em quatro grupos denominados de SNP-1 a 4.

No grupo SNP-1 ficaram agrupadas as cepas humanas, além de alguns isolados de aves e swab de arrasto, positivos para os genes de resistência: *bla<sub>TEM-1B</sub>, aac(3)-Via, aac(6')-Iaa, aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, aadA1, tet(A), gyrA, parC, sul2, sul1*. Os grupos SNP-2 e SNP3, são compostos por isolados de alimentos e aves apresentaram um perfil de resistência contendo

os genes: *bla<sub>CMY-2</sub>*, *aac(6')-Iaa*, *tet(A)*, *gyrA*, *parC* e *sul2*. O grupo SNP-4 formado em sua maioria por isolados de aves apresentaram os genes *bla<sub>CMY-2</sub>*, *aac(6')-Iaa*, *tet(A)*, *sul2*.

As cepas que contém o gene *bla<sub>CMY-2</sub>* diferem de acordo com a procedência, no grupo SNP-1 todas as cepas são de Campinas, no grupo SNP-3 todas as cepas são de São Paulo e nos grupos SNP-1 e 4 a procedência é variável.

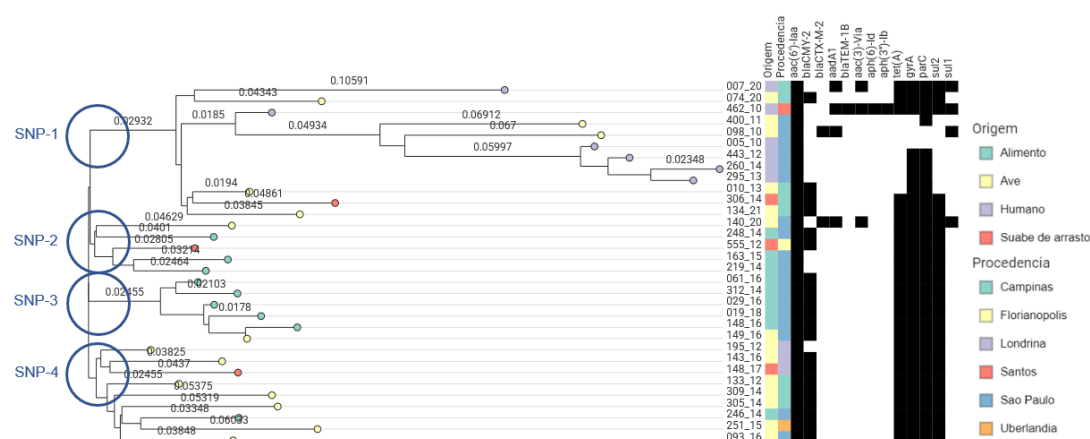


Figura 5 - Árvore filogenética construída com base em *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) de alta qualidade (CSI Phylogeny) de 32 isolados de *Salmonella* Heidelberg estudados, construída com a aplicação web Microreact. Os círculos coloridos representam a origem dos isolados com base na legenda. Os resultados demonstrados no dendrograma são: sítio de origem, procedência e genes de resistência detectados<sup>2</sup>

<sup>2</sup>Os resultados detectados por sequenciamento do genoma completo são apresentados em quadrados pretos (detectados) ou brancos (não detectados), assim como a origem e procedência com suas respectivas cores de acordo com a legenda.

#### 4.9 CORE GENOME MLST (cgMLST)

Foi gerada uma árvore de extensão mínima (*minimum spanning tree*) utilizando o software BIONUMERICS 8.0 (Applied maths) demonstrando a similaridade genotípica gerada com base na diferença dos alelos encontrados em um conjunto de loci de 3002 genes (Enterobase).

Através da árvore de extensão mínima foi possível verificar que o isolado 010\_13 proveniente de ave, é indicado como ser um clone ancestral entre os isolados estudados (Figura 6 e 7). Este isolado apresenta um perfil de resistência fenotípico a AMP, AMC, CTX, CRO, FOX, CAZ, S, NA, PEF e um perfil genotípico de resistência com os genes *bla*CMY-2, *aac*(6')-*laa*, e mutações em *gyrA* e *parC*.

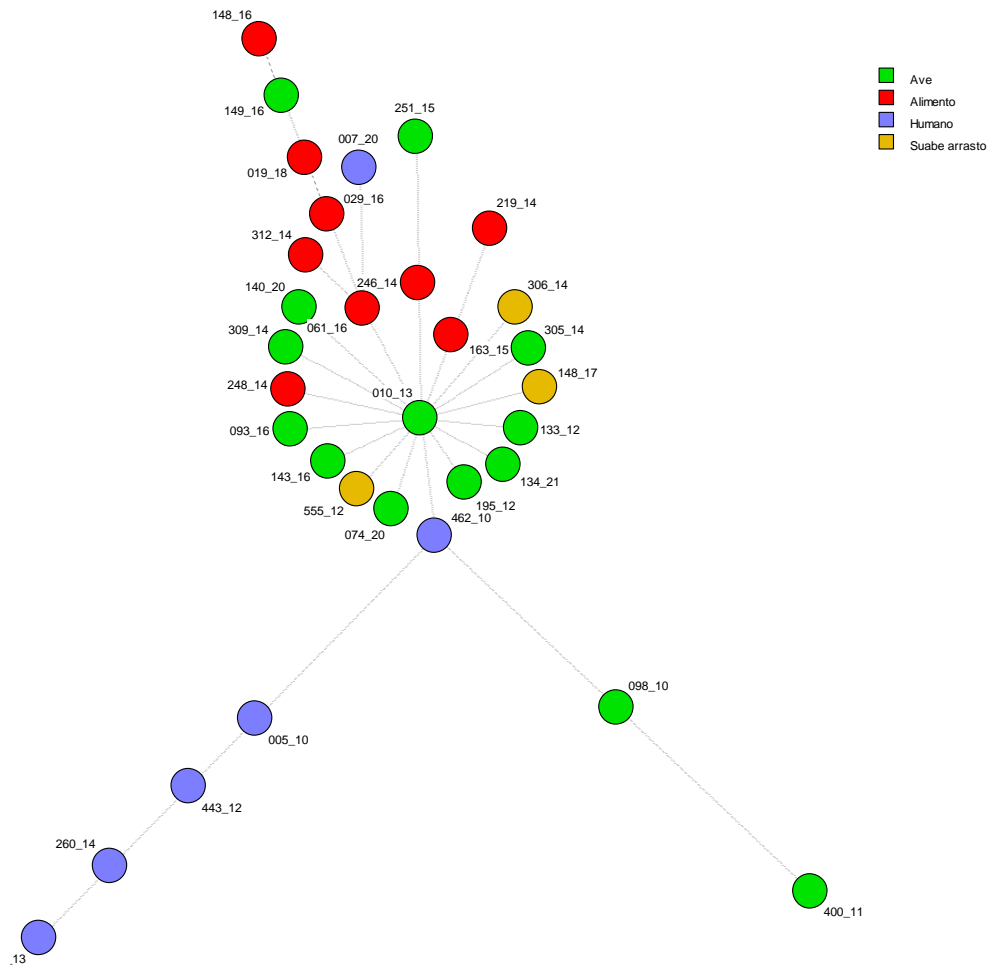


Figura 6 - Árvore de extensão mínima de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, mostrando seu sítio de origem.



No dendrograma abaixo, as cepas positivas para o gene *bla<sub>CMY-2</sub>* estão agrupadas em ramos com uma diferença de até 42 alelos, como demonstrado na **Erro! Autoreferência de indicador não válida.** e diferem de acordo com a sua origem e procedência. Podemos verificar no destaque em vermelho, um grupo com diferença de até nove alelos em isolados de alimento e ave provenientes de São Paulo, os resultados demonstram uma alta similaridade entre os isolados.



Figura 7 - Dendrograma de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, classificadas com base nos genes de resistência: *bla<sub>CMY-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *bla<sub>TEM-1B</sub>*, *qnrB19* e não detectada (ND). A diferença no número de alelos está demonstrada nos ramos

Quando realizado o estudo de cgMLST dos nossos 32 isolados com 64 genomas presentes no banco de dados Enterobase (05 de Janeiro de 2023), o isolado 010\_13 proveniente de ave, parece não se manter como sendo um possível clone ancestral entre os isolados analisados, mas a alta similaridade entre as cepas com base na diferença dos alelos ainda se mantem (**Erro! Autoreferência de indicador não válida.** e Figura 9).

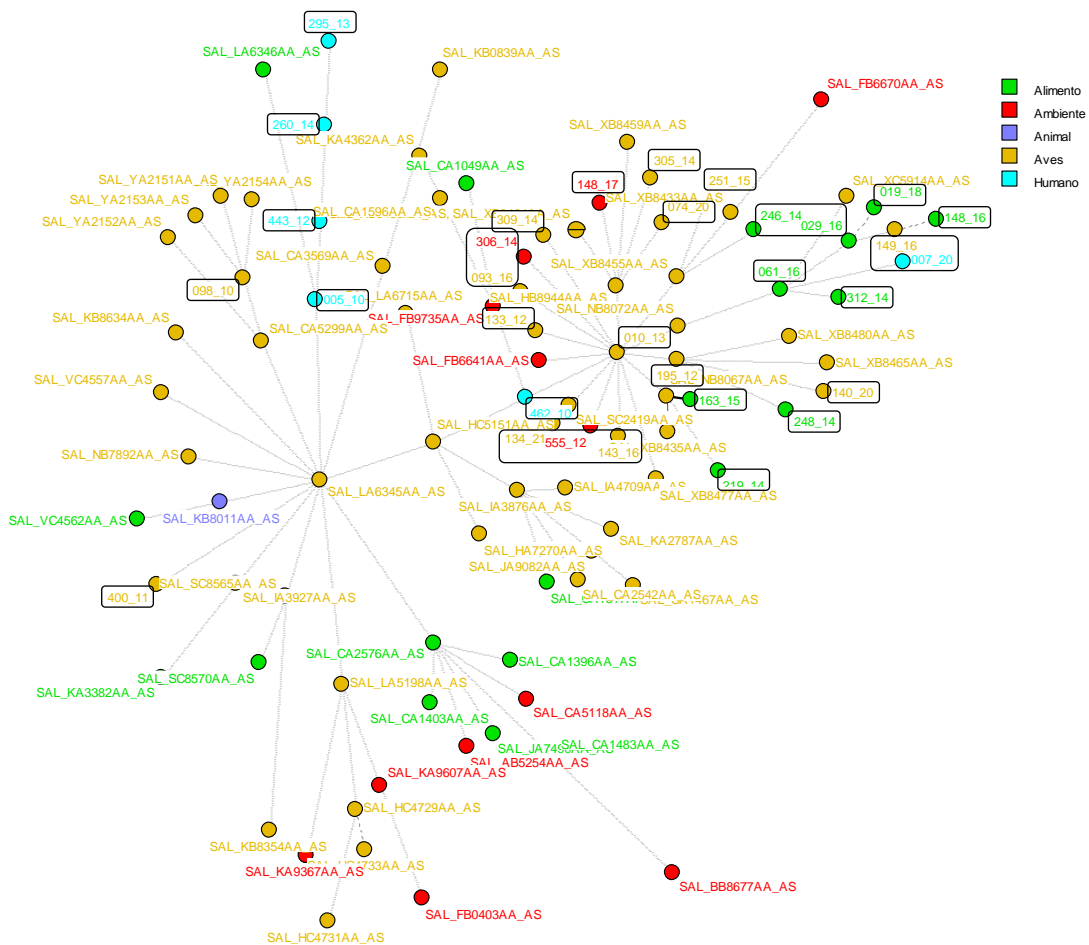


Figura 8 - Árvore de extensão mínima de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella Heidelberg* estudadas, em comparação com as cepas coletadas do banco de dados Enterobase mostrando seu sítio de origem e identificação dos isolados seleccionados. As cepas do nosso trabalho estão destacadas com um quadro preto para melhor visualização.

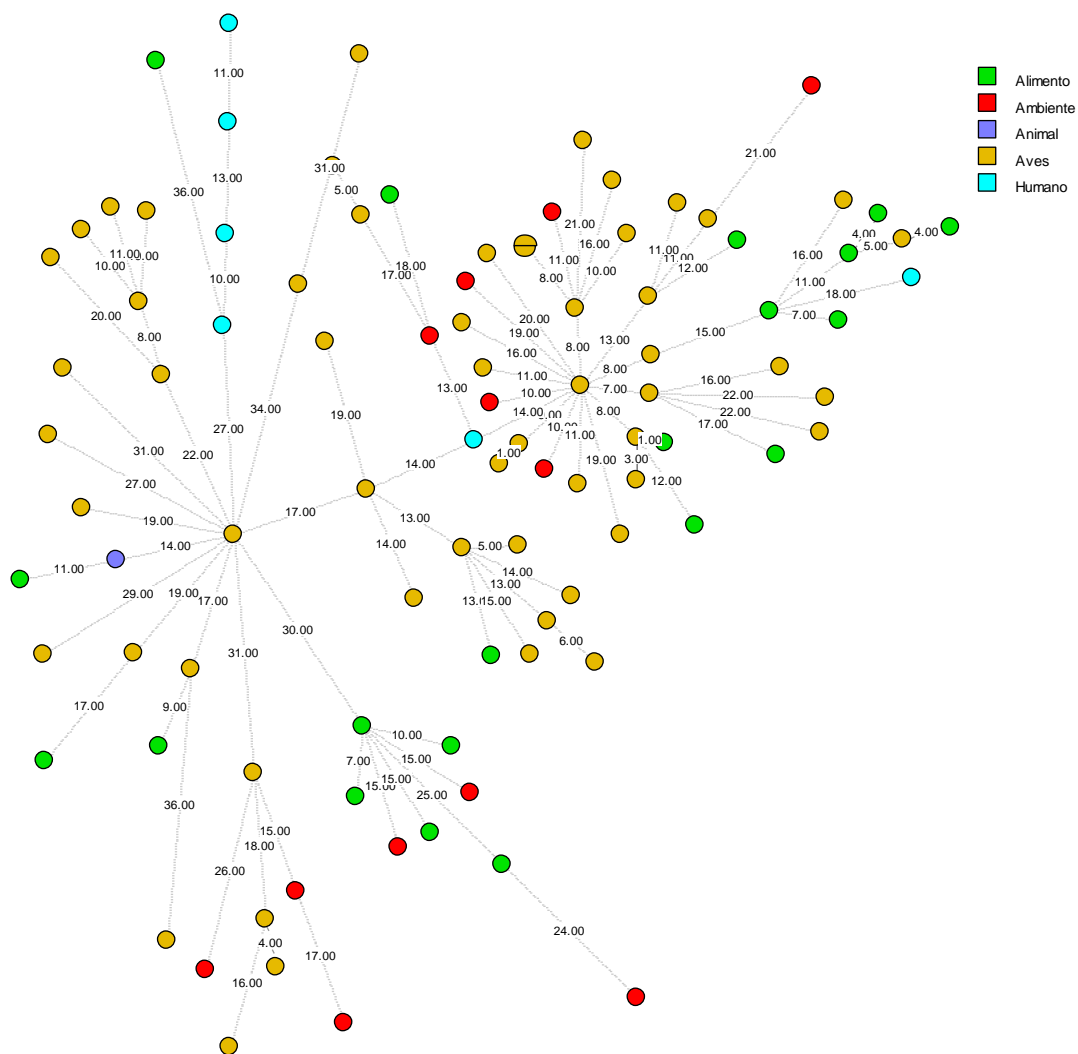


Figura 9 - Árvore de extensão mínima de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, em comparação com as cepas coletadas do banco de dados Enterobase mostrando seu sítio de origem e identificação dos isolados selecionados e o número de diferença de alelos demonstrado entre os nós.

Quando analisamos o perfil de resistência genotípico a  $\beta$ -lactâmicos dos isolados com a detecção dos genes *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, e *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, verificamos a divisão entre dois grupos que denominamos de grupo A e B como demonstrado na Figura 10. O grupo A tem um predomínio de cepas contendo o gene *bla*<sub>CMY-2</sub>, e ao mesmo tempo engloba grande parte das cepas do nosso estudo dando destaque para aves e alimentos. Já o grupo B apresenta baixa detecção dos genes  $\beta$ -lactâmicos onde se concentra a

minoria das cepas do nosso estudo e grande parte das cepas humanas analisados pelo nosso estudo.

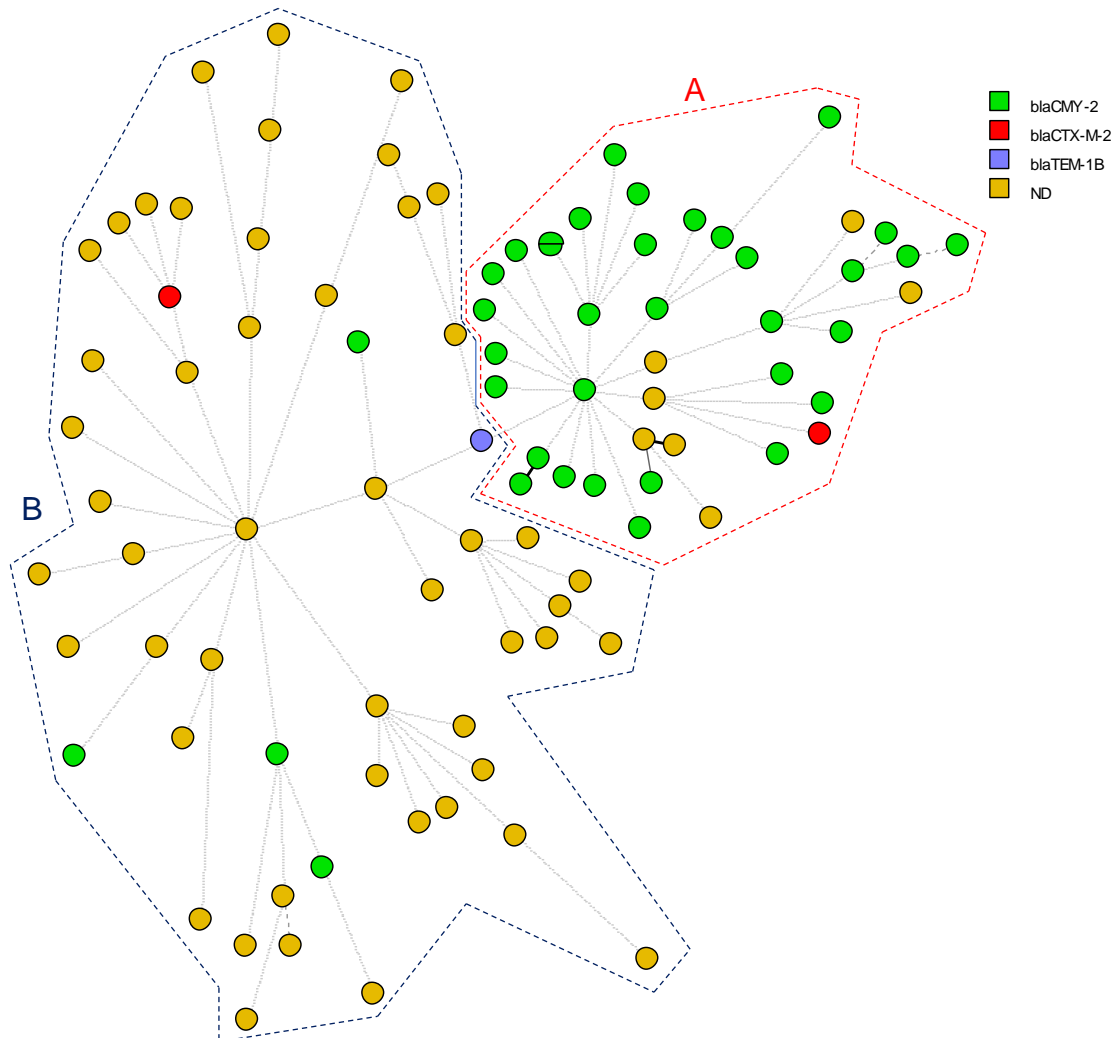


Figura 10 - Árvore de extensão mínima de similaridade alélica gerada a partir da análise de cgMLST (Enterobase) das 32 cepas de *Salmonella* Heidelberg estudadas, em comparação com as cepas coletadas do banco de dados Enterobase mostrando o perfil de resistência genotípico a  $\beta$ -lactâmicos dos isolados com os genes *bla*<sub>CMY-2</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, e *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.

## 5 DISCUSSÃO

*Salmonella enterica* é a causa comum de doença diarreica em humanos e o consumo de carne de aves contaminada pode ser uma importante fonte de contaminação. No presente estudo, foram caracterizadas cepas *S. Heidelberg* de origem animal e alimentar que representam 71,9% (n=23) das cepas avaliadas, e cinco cepas de origem humana. O Brasil atualmente é o maior exportador de carne de frango do mundo, e com isso pode se colocar como um potencial introdutor de sorotipos de *Salmonella* por meio de produtos alimentícios.

O estudo de ALIKHAN et al., 2022 demonstra que *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* são os sorotipos mais prevalentes em amostras de frango de corte importados do Brasil para o Reino Unido. A maior prevalência desses sorotipos ocorreu após a introdução de uma vacina contra *S. Enteritidis* em 2003, a qual provocou uma mudança na dinâmica dos sorovares, pois *S. Enteritidis* era o principal sorotipo de *Salmonella* nas carnes de aves e de frango exportadas do Brasil na época (KANASHIRO et al., 2005; TAVECHIO et al., 1996). Um cenário semelhante foi descrito nos Estados Unidos, onde esforços direcionados contra *S. Enteritidis* promoveram o aumento de outros sorotipos, como *Heidelberg* e *Kentucky* (FOLEY et al., 2011).

Além da introdução da vacina para *S. Enteritidis*, mudanças na epidemiologia também podem ter sido influenciadas pelo uso de antimicrobianos (ROWLANDS et al., 2014). O uso de antimicrobianos como método profilático, não é mais comum, porém antes o seu uso favorecia a emergência de bactérias resistentes que poderiam chegar aos consumidores. De acordo com o monitoramento de resistência antimicrobiano realizado pelo *World Health Organization* (WHO), a emergência de *Salmonella* multirresistente em muitos países é considerada um importante problema de saúde pública (WHO, 2014). Em particular, resistência a cefalosporinas de terceira geração e fluorquinolonas, são uma das maiores ameaças à saúde global e à segurança alimentar.

Em nosso trabalho, 81,3% das cepas estudadas apresentaram resistência a três ou mais diferentes classes de antimicrobianos podendo ser classificadas como multirresistentes (MAGIORAKOS et al., 2012). A circulação de cepas de *Salmonella* multirresistente vem se tornando um problema de saúde pública, e considerada um alerta mundial, pois acaba limitando as opções de tratamento para as infecções bacterianas, além de promover a transferência de genes de resistência entre micro-organismos patogênicos (FARDSANEI et al., 2018; IGLESIAS et al., 2017). CARATTOLI et al., 2002 demonstra que o aumento da resistência a algumas cefalosporinas, como: ceftriaxona, ceftazidima e cefotaxima em *Salmonella*, pode estar relacionado com a utilização de uma cefalosporina de terceira geração usada na produção animal, o ceftiofur.

No estudo de ALIKHAN et al., 2022 observou-se que os dados dos genomas de *S. Heidelberg* apresentaram genes de resistência a sulfonamidas (*sul2*), tetraciclinas (*tet(A)*) e  $\beta$ -lactâmicos (*bla<sub>CMY-2</sub>*) em grande parte das cepas analisadas. Estes resultados corroboram com nossos resultados, uma vez que, 67% de cepas de aves obtidas entre os anos de 2012 a 2021, apresentavam estes genes de resistência.

No Brasil, o gene *bla<sub>CMY-2</sub>* foi primeiramente descrito em três isolados de *S. Heidelberg* no estudo de PEIRANO, 2006. Posteriormente, outros estudos SOUZA et al., 2020; TIBA-CASAS et al., 2019 também reportavam a caracterização de *S. Heidelberg* produtora de CMY-2 mediada por plasmídeo, isoladas de alimentos, aves e ambiente de granjas.

O gene de resistência *bla<sub>CMY-2</sub>* pode ser encontrado em plasmídeos transferíveis do tipo IncI1 (EDIRMANASINGHE et al., 2017; RODRIGUES et al., 2017; SOUZA et al., 2020; TIBA-CASAS et al., 2019) e IncC, anteriormente conhecidos como IncA/C (CAMPOS et al., 2018; MONTE et al., 2019; RABELLO et al., 2020). CMY-2 é a AmpC plasmidial de maior frequência e está mundialmente distribuída com diversos relatos de sua detecção na literatura (CAMPOS et al., 2018; EDIRMANASINGHE et al., 2017).

O gene *bla<sub>CMY-2</sub>*, é comumente carregado por plasmídeos que são classificados como IncI1 ou IncC (MONTE et al., 2019; RABELLO et al., 2020; RODRIGUES et al., 2017; TIBA-CASAS et al., 2019). No estudo de ALIKHAN et al., 2022, *bla<sub>CMY-2</sub>* foi localizado com os genes *sul2* e *tet(A)* em plasmídeos IncC ou independentemente em plasmídeos IncI1. Os plasmídeos que conferem resistência a  $\beta$ -lactâmicos, sulfonamidas e tetraciclina provavelmente conferiram uma vantagem competitiva a *S. Heidelberg* em um cenário de alto uso de antimicrobianos. Em nosso estudo, a caracterização *in silico* de plasmídeos correlacionados com genes *bla<sub>CMY-2</sub>*, *sul2* e *tet(A)* (n=19/59,4%) foi identificada em 15 isolados que apresentaram ambos os plasmídeos, quatro isolados apresentando apenas IncC e um isolado apresentando apenas IncI1.

Em nosso trabalho, detectamos 62,5% das cepas apresentando o gene *bla<sub>CMY-2</sub>*. Porém, o presente trabalho não pode caracterizar o grupo de incompatibilidade plasmidial (IncI1 ou IncC), associado ao gene *bla<sub>CMY-2</sub>*, uma vez que, a maioria das cepas continham ambos os tipos de plasmídeos. Como descrito na literatura, para validar esta caracterização, seria necessário o sequenciamento de *long-reads* (MinION-Oxford Nanopore ou PacBio), ou a montagem híbrida utilizando os dados do sequenciamento de *long-reads* e o conjunto de dados do sequenciamento de *short-reads* (Illumina), a fim de garantir uma montagem e cobertura total do genoma bacteriano (cromossomo e plasmídeos).

Segundo ANTUNES et al., 2016 a transmissão de genes de resistência em humanos e aves têm sido associadas a diversas famílias de plasmídeos, sendo uma dessas o grupo plasmidial IncHI2 associado com *bla<sub>CTX-M-2</sub>*. Em nosso estudo, os plasmídeos das duas cepas isoladas de aves e positivas para *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, foram caracterizados como o grupo de incompatibilidade plasmidial IncHI2/Nearest ST3 utilizando a ferramenta de caracterização do plasmídeo pMLST (*plasmid Multi Locus Sequence Typing (MLST)*). No esquema de caracterização do grupo de incompatibilidade plasmidial IncHI2, dois genes são tipados, e nestas cepas, o alelo smr0199 não foi detectado, sendo apenas o alelo smr0018 caracterizado. Como

descrito por CAMPOS et al., 2016; e YI et al., 2017 a ausência de um alelo presente no plasmídeo IncHI2 pode ocorrer, pois este plasmídeo está associado à ocorrência de múltiplos eventos de recombinação e surgimento de nova variante.

Neste trabalho, encontramos a prevalência de resistência à classe das tetraciclina (78,1%), sulfonamidas (78,1%) e aminoglicosídeos (28,1%). Estes resultados são descritos na literatura, e mostram que estes perfis de resistência são comumente encontrados em *Salmonella* (ALIKHAN et al., 2022; SOUZA et al., 2020). Para *Salmonella* e *Shigella* aminoglicosídeos podem apresentar atividade *in vitro*, mas não são efetivos clinicamente, e não devem ser reportados como sensíveis (CLSI, 2021). O motivo pelo qual reportamos resultados sobre aminoglicosídeos parte do ponto de vista epidemiológico, fora da clínica, uma vez que é importante destacar por se tratar de amostras das mais variadas fontes, a dada relevância da disseminação da resistência no ambiente, já que nas nossas cepas contém genes que podem ser mobilizáveis, mesmo que ainda alguns deles não estejam sendo expressos. A resistência a tetraciclina foi detectada em 78,1% das cepas analisadas. O uso da tetraciclina como promotor de crescimento é proibido no Brasil desde 1998, portanto esse antimicrobiano não é mais utilizado como uma das drogas terapêuticas na produção animal e sim ceftiofur (DIAS DE OLIVEIRA et al., 2005; LITTLE et al., 2008).

As fluoroquinolonas são amplamente utilizadas como fármacos terapêuticos na medicina veterinária e o uso desses compostos pode selecionar cepas mutantes de *Salmonella* resistentes ao NA ou com sensibilidade reduzida às fluoroquinolonas (FERRARI et al., 2011, 2013; LEE et al., 2011). A resistência fenotípica ao NA foi detectada em 90,6% das cepas analisadas e foram acompanhadas pela detecção de mutações em genes cromossômicos apresentando duas diferentes mutações em *parC* (p.T57S, p.S80R) e três diferentes mutações no gene *gyrA* (p.S83F, p.A119E, p.D87G). Em relação aos genes de resistência a fluorquinolonas mediados por plasmídeo, foi detectado apenas o gene *qnrB19* em cinco cepas (15,6%) e uma delas apresentou resistência fenotípica a CIP.



Cepas resistentes ao NA vem aumentando desde os anos 2000, podendo estabelecer altas taxas de resistência para cepas associadas à intoxicação alimentar (ROWLANDS et al., 2014). Em nosso trabalho, o teste de concentração inibitória mínima (CIM) para fluorquinolonas demonstrou que 87,5% das cepas estudadas foram sensíveis a ciprofloxacina, 9,4% apresentaram perfil intermediário de resistência e apenas uma cepa foi resistente para ciprofloxacina (CIM>1µg/mL), enquanto 90,6% apresentaram perfil de resistência ao ácido nalidíxico (CIM>256 µg /mL). Dados presentes na literatura demonstram que mutações cromossomais estão associadas à resistência ao NA, enquanto a presença dos genes plasmidiais confere susceptibilidade reduzida a ciprofloxacina (LEE et al., 2011; STEVENSON et al., 2007; WHICHARD et al., 2007). Além disso, a presença de resistência intermediária a ciprofloxacina alerta para a necessidade de um monitoramento mais frequente de linhagens de *S. Heidelberg* em vista do potencial de seleção de linhagens resistentes a antimicrobianos desta classe, que são considerados de escolha para tratamento da salmonelose em humanos.

Nos últimos anos, um progresso surpreendente foi feito para entender as habilidades dos patógenos bacterianos de aderir, invadir, sobreviver e persistir em vários nichos, além das características que os permitem ter tanto sucesso com um repertório diversificado de fatores de virulência. Um banco de dados de fatores de virulência como o utilizado por nosso trabalho, nos possibilita identificar genes com base no conhecimento atual, fornecendo informações significativas destinadas a expor possíveis alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos e estratégias preventivas para estudos posteriores (CHEN, 2004).

ROWLANDS et al., 2014 realizaram um estudo em 237 cepas de *Salmonella* spp., associadas ou não à salmonelose de origem alimentar no Brasil e o gene *invA* foi identificado em todas as cepas. O gene *InvA* é conservado entre os sorotipos de *Salmonella* e é um marcador genético muito utilizado para detecção molecular desse patógeno por PCR (D'SOUZA; CRITZER; GOLDEN, 2009; LIANG et al., 2011). Neste estudo, o

gene *invA* associado à invasão epitelial e à produção de proteínas do T3SS também foi detectado em todos os isolados.

Vários *operons* fimbriais, incluindo *Lpf*, são importantes para o transporte e disseminação de *Salmonella* a longo prazo (RUBY et al., 2012). Este fator de virulência associado à adesão bacteriana foi detectado em todas as cepas de nosso estudo. Além disso, o fator *MisL* contribui para a colonização de *Salmonella* em camundongos, frangos e porcos, mas não desempenha um papel significativo em bezerros, enquanto *ShdA* influencia na persistência de *S. Typhimurium* em camundongos, mas não em porcos (BOYEN et al., 2006; CARNELL et al., 2007; KINGSLEY et al., 2002b; MORGAN et al., 2004). Esses dois fatores também foram detectados em todas as cepas de nosso estudo.

O pseudogene *ratB*, que está envolvido na colonização e persistência intestinal (HOLT et al., 2009), foi detectado em todas as cepas. As fímbria tipo 1 e o fator *Agf* são altamente conservados entre os isolados de *Salmonella*, enquanto o fator *Pef* é encontrado apenas em alguns sorotipos (BÄUMLER et al., 1997). Nas cepas analisadas, tanto a fímbria do tipo 1 quanto o fator *Agf* foram encontrados em 100% das cepas, como já prevê a literatura. Por outro lado, o operon plasmidial *Pef*, associado à adesão de *S. Typhimurium* a células intestinais de camundongos (ASTEN; DIJK, 2005), não foi detectado nas cepas deste estudo.

Verificou-se que a *Salmonella* responde ao ambiente ácido por meio de um sistema adaptativo complexo, chamado de resposta de tolerância ácida, que requer a síntese de mais de 50 proteínas de choque ácido, incluindo os fatores *RpoS*  $\sigma$ -factor, *PhoPQ*, *Ada* e *Fur*. Em *S. Typhimurium* *RpoS* e *PhoPQ* forneceram proteção contra ácidos inorgânicos, enquanto *RpoS* e *FurR* ofereceram proteção contra ácidos orgânicos (BEARSON; WILSON; FOSTER, 1998; BEARSON; BEARSON; RASMUSSEN, 2006). Neste estudo o fator *PhoPQ* foi detectado em todas as cepas.

Uma vez aderida ao epitélio intestinal, *Salmonella* tipicamente expressa sistema de secreção do tipo III (T3SS), que é um complexo multiproteico que facilita a captação e invasão endotelial. O aparato T3SS

atua como uma “seringa molecular” (um canal entre o citoplasma bacteriano e a membrana da célula hospedeira) para transportar toxinas e outras proteínas efetoras para as células intestinais e está associado a mais de 20 proteínas estruturais e regulatórias. Várias proteínas efetoras, como, SipA/B/C/D, SopA/B/D/E/E2, também são secretadas através do T3SS (GALÁN, 2001; MARLOVITS et al., 2004; PHOEBE LOSTROH; LEE, 2001; SCHLUMBERGER; HARDT, 2006). Esses genes codificados por SPI-1, como *sipA*, *sipD*, *sopB*, *sopD* e *sopE2* permitem que *Salmonella* invada células fagocíticas e não fagocíticas, e em nosso trabalho foram detectados em todas as cepas com exceção dos genes *sipA*, *sipD* que foram detectados em todas as cepas exceto 148\_17 e 074\_20.

O trabalho de KUIJPERS et al., 2019 demonstra que cepas associadas a surtos causados por *S. Heidelberg* e *S. Thompson* de origem alimentar e humana têm uma taxa de infectividade *in vitro* comparáveis. Cepas relacionadas a surtos tem uma taxa de infectividade *in vitro* maior do que das cepas não relacionadas a surtos, originárias de produtos de frango. Os autores também avaliam que entre os 233 genes de virulência investigados, 101 mostraram variabilidade na presença/ausência das cepas de *Salmonella* estudadas, sendo a taxa de infectividade *in vitro* associada com os genes de virulência *mig-5*, *pef*, *rck* e *spv*. No entanto, nem todos os sorotipos que tem uma taxa de infectividade *in vitro* relativamente alta, estão associados aos genes de virulência declarados acima, demonstrando que não houve associação clara entre a virulência genotípica e a taxa de infectividade *in vitro*. Em nosso estudo, o fator de virulência que promove resistência sérica Rck não foi detectado em nenhuma cepa avaliada.

Conforme descrito na literatura, *Salmonella* spp. é um patógeno invasivo, onde estão presentes diferentes fatores de virulência e podemos observar a presença dos seus respectivos genes de virulência em nossos isolados (D’SOUZA; CRITZER; GOLDEN, 2009; LIANG et al., 2011; CAMPIONI; MORATTO BERGAMINI; FALCÃO, 2012).

A tipagem de plasmídeos é importante devido à sua capacidade de detectar uma ampla variedade desses elementos que são frequentemente

associados à resistência antimicrobiana em patógenos bacterianos clinicamente relevantes. Os plasmídeos são moléculas de DNA circulares ou lineares de fita dupla capazes de replicação autônoma e transferíveis entre diferentes espécies bacterianas e clones (CARATTOLI et al., 2014). A maioria dos plasmídeos conhecidos foi identificada por conferir fenótipos sujeitos a seleção positiva no hospedeiro bacteriano, como a presença de resistência antimicrobiana ou genes de virulência. Tais características auxiliam na disseminação bem sucedida de diferentes tipos de plasmídeos entre bactérias de diferentes origens e origens geográficas. A aquisição de plasmídeos portadores de genes de resistência antimicrobiana ou de virulência pode alterar drasticamente a prevalência de clones bacterianos multirresistentes e/ou virulentos. Portanto, é importante não apenas estudar a epidemiologia molecular de diferentes clones bacterianos, mas também estudar e compreender a epidemiologia molecular de plasmídeos transferíveis (CARATTOLI et al., 2014).

No presente estudo, realizamos a análise pMLST do grupo de incompatibilidade plasmidial IncI1, sendo que 94,4% das cepas estudadas foram classificadas como ST12. A literatura demonstra que IncI1/ST12 está disseminado mundialmente, estando vinculado à disseminação dos genes de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC plasmidiais (*bla<sub>CMY</sub>*) (CARATTOLI et al., 2021; CASTELLANOS et al., 2017). No grupo de incompatibilidade plasmidial IncC, 100% das cepas foram classificadas como ST2. Os estudos de CAMPOS et al., 2018; GLENN et al., 2011; LINDSEY et al., 2011; RODICIO et al., 2011 demonstram que o perfil plasmidial IncC/ST2 foi detectado em cepas de *S. Heidelberg*, isoladas de carne de ave e têm sido associados à dispersão plasmidial em diversos sorotipos multirresistentes aos antimicrobianos. Estes estudos evidenciam o fato de que, por serem considerados plasmídeos grandes, podem carrear genes codificadores de resistência para diversos antimicrobianos, porém muitas vezes, o tamanho do plasmídeo está mais relacionada ao aparato de conjugação, e não exatamente à quantidade de genes de resistência.

Um método de tipagem molecular utilizado em *Salmonella* é o MLST. Neste estudo, todas as cepas do sorotipo Heidelberg apresentaram o *sequence type* 15 (ST15). Este ST é bem descrito na literatura tanto em nosso país como mundialmente, e comumente associado a este sorotipo (CAMPOS et al., 2018; SILVEIRA et al., 2021; VANDEN BERG et al., 2019).

Outro método de genotipagem de *Salmonella* é o PFGE, considerado método padrão ouro para a comparação genética de microorganismos, pois tem como vantagem sua alta concordância de resultados quando há ausência de dados e relação epidemiológica, sendo uma técnica altamente discriminatória. Devido a seu poder discriminatório, a PFGE tem sido o método para a vigilância e investigação de DTAs que permite determinar a relação clonal entre as cepas, confirmar um surto, e identificar fontes de origem de uma cepa ou surto (GERNER-SMIDT et al., 2006). Em nosso estudo, o dendrograma de similaridade genotípica apresentou 80,4% de similaridade entre as cepas, e agrupou as cepas estudadas em 21 pulsotipos diferentes. As cepas que carregam o gene *bla<sub>CMY-2</sub>* (n=20) possuem 13 pulsotipos distintos. O grupo das cepas isoladas de humanos (n=5) apresentou dois pulsotipos diferentes, com uma similaridade de 86% e se manteve o perfil PFGE ao longo do tempo. Apesar de nossos resultados demonstrarem uma alta similaridade genotípica (>80%) neste sorotipo, alguns trabalhos de tipagem por PFGE em *S. Heidelberg* de origem avícola e de animais produtores de alimentos demonstraram uma alta diversidade genotípica de aproximadamente >50% (LYNNE et al., 2009; SOUZA et al., 2020).

Apesar da técnica de PFGE ser extremamente utilizada, ter a metodologia padronizada e ser considerada método ouro, ela tem limitado o poder discriminatório para detectar diferenças, por exemplo, no sorotipo Enteritidis, o qual é prevalente em surtos alimentares, existindo uma clara necessidade de melhor discriminação dos métodos de tipagem nos laboratórios de saúde pública (NADON et al., 2017). O sequenciamento do genoma completo permite identificar diferenças filogenéticas, fatores de virulência e mecanismos de resistência aos antimicrobianos. Esta técnica

vem possibilitando o aumento da capacidade de identificar e investigar clones que possam parecer desconectados por estarem geograficamente distantes, além de distingui-los dos casos de ocorrência esporádica ao mesmo tempo (NADON et al., 2017). A técnica de WGS é considerada atualmente o estado-da-arte para caracterização de patógenos bacterianos, e a análise de sequências genômicas permite identificar SNPs, a mais discriminatória técnica conhecida até o presente.

Outro tópico importante é que a utilização da plataforma de WGS, na caracterização da resistência antimicrobiana numa população de bactérias, tem vantagens comparadas às demais metodologias genotípicas disponíveis atualmente, particularmente àqueles mecanismos que ainda não foram completamente caracterizados e que são passíveis de sofrer recombinação. A resistência pode ser mediada por plasmídeos, cuja importância é decorrente de seu potencial de disseminação. Nos últimos anos, o aumento da resistência antimicrobiana observada para os diferentes patógenos, incluindo *Salmonella*, tem sido de grande interesse em saúde pública no nosso país, assim como em nível global. O emprego de agentes antimicrobianos em animais destinados à alimentação humana é, um dos fatores que provocam a emergência e disseminação de cepas resistentes, uma vez que os alimentos de origem animal podem representar a principal fonte de transmissão de algumas zoonoses (BACCI et al., 2012). Porém, atualmente já é consenso que a criação animal tem sim um papel muito importante na disseminação de cepas resistentes, mas a emergência e disseminação é multifatorial, podendo ter várias origens e várias formas de disseminação, não podemos apontar um único alvo como principal causador da emergência. Da mesma forma, é necessário buscar alternativas ao uso dos antimicrobianos nas criações animais, para que estas se mantenham seguras e saudáveis.

ALIKHAN et al., 2022 realizaram um estudo em cepas de *S. Heidelberg* isoladas no Brasil, e utilizando a ferramenta do sequenciamento de genoma completo, observaram que os genomas deste sorotipo formaram clados distintos dos isolados do resto do mundo. A análise temporal dos

clados sugeriu a possível data de emergência dessas salmonelas por volta do início dos anos 1996 e 2004, provavelmente auxiliadas pela introdução da vacina *S. Enteritidis* na produção de frangos do Brasil em 2003. Em nosso estudo, tanto a árvore de extensão mínima gerada a partir da análise de cgMLST com as montagens das 32 cepas de *S. Heidelberg* estudadas quanto a árvore contendo os isolados do Enterobase, demonstraram alta similaridade entre as cepas.

Quando se analisou apenas as 32 cepas do nosso estudo pelo cgMLST, foi identificado um isolado proveniente de ave como sendo um possível clone ancestral entre os isolados estudados, com base na diferença do número de alelos encontrados. Este isolado apresenta um gene de resistência que codifica uma beta lactamase do tipo AmpC. Quando foi realizada a comparação com isolados depositados no banco de dados mundial Enterobase, parte dos nossos isolados, principalmente de origem não humana (aves e alimentos), agruparam-se apresentando como característica comum a presença do gene *bla<sub>CMY-2</sub>*. Os isolados de origem humana não possuem este gene (*bla<sub>CMY-2</sub>*) e, portanto, foram alocados fora deste ramo.

Os surtos de doenças infecciosas geralmente envolvem o isolamento do agente causador em vários laboratórios de um país ou mesmo de vários países. A detecção precoce de surtos, portanto, muitas vezes requer uma rápida comparação de dados de diferentes laboratórios. O WGS melhora a caracterização de rotina de agentes de doenças infecciosas em laboratórios microbiológicos e os dados de sequenciamento são atraentes porque ambos fornecem alta resolução e um formato de dados padronizado, que pode ser compartilhado e comparado entre laboratórios e ao longo do tempo. A análise de SNPs pode ser útil especialmente quando durante a detecção de surtos, é necessário identificar *clusters* dentro de cepas altamente semelhantes, uma vez que a abordagem de SNPs pode fornecer uma resolução muito alta das cepas analisadas (KAAS et al., 2014).

A análise de SNPs revelou uma diferença mínima de 15 SNPs e máxima de 157 SNPs entre as cepas estudadas. O dendrograma gerado

demonstrou uma alta similaridade genética entre os isolados, os quais foram separados/classificados em quatro grupos. O grupo SNP-1 apresentou em sua maioria isolados de origem humana, resistentes a aminoglicosídeos e sulfonamidas. Os grupos SNP-2, SNP3 e SNP-4 são compostos por isolados de alimentos e aves que apresentaram um perfil de resistência a cefalosporina, tetraciclina e sulfonamida. Em nosso estudo, os resultados obtidos das metodologias de PFGE, cgMLST e a análise de SNPs demonstraram uma alta similaridade entre os isolados, revelando assim resultados concordantes entre si.

Apesar do aumento da frequência deste sorotipo em aves e alimentos, dados de vigilância coletados no Reino Unido demonstram que não houve aumento da incidência de *S. Heidelberg* em casos de doença em humanos e animais após o aumento desse sorotipo em aves brasileiras importadas (ALIKHAN et al., 2022). Mesmo que a *Salmonella* presente em produtos de aves importados do Brasil chegue aos consumidores do Reino Unido, parece ser pouco provável que ela cause doença. Houve uma incidência baixa e estável de infecções por *S. Heidelberg* ( $\leq 0,5\%$ ) derivadas de humanos entre 2004 e 2019 no Reino Unido, em comparação com a proporção de *S. Enteritidis* ou *S. Typhimurium*, que são os sorotipos responsáveis pelo maior número de casos em humanos (ALIKHAN et al., 2022). Porém pode estar havendo disseminação silenciosa de genes de resistência plasmidiais para a microbiota dos consumidores.

No presente estudo, as cepas de origem humana não apresentaram o gene de resistência a beta-lactamase do tipo AmpC *bla*<sub>CMY-2</sub>, mas nos traz um alerta do potencial de disseminação deste tipo de resistência antimicrobiana. Infelizmente, não há dados oficiais sobre surtos alimentares por *S. Heidelberg* no Brasil, para avaliar o impacto deste sorotipo na saúde pública brasileira. O trabalho de FERNANDES et al., 2022 destaca que entre isolados de *Salmonella* de origem não humana o sorotipo Heidelberg representou 4% do total dos isolados do levantamento histórico, sendo este o sorotipo com maior aumento na frequência entre as fontes não humanas, principalmente associados a amostras de aves. Além disso, a *S. Heidelberg*



foi relatada causando surtos em 13 estados dos EUA, com 33 internações nos últimos 10 anos (CDC, 2018), e vem sendo o sorotipo mais frequente envolvido em doenças humanas ligadas ao consumo de carne de aves nos EUA (ZHAO et al., 2008).

As características de genes de resistência mobilizáveis e as altas taxas de resistência a antimicrobianos em cepas isoladas de produtos avícolas e alimentos demonstraram um potencial amplo e com capacidade de disseminação biológica e geográfica significativa. Estudos são necessários para avaliar estratégias de intervenção efetiva, a fim de reduzir a resistência antimicrobiana nesse sorotipo e no contexto geral de *Salmonella*. Em conjunto, os resultados obtidos possibilitaram uma melhor caracterização de *S. Heidelberg* quanto à diversidade genotípica, potencial patogênico e perfil genotípico e fenotípico de resistência a antimicrobianos. Os resultados encontrados neste trabalho reforçam a importância da investigação e monitoramento de linhagens desta sorovariedade por autoridades de saúde pública e segurança alimentar no Brasil.

## 6 CONCLUSÕES

- As cepas de *S. Heidelberg* foram caracterizadas como multirresistentes, apresentando perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos utilizados na área clínica, alertando para o potencial risco de linhagens resistentes em alimentos e no ambiente.
- As cepas de aves apresentaram genes de resistência a sulfonamidas (*sul2*), tetraciclinas (*tet(A)*) e  $\beta$ -lactâmicos (*bla<sub>CMY-2</sub>*) que estão mundialmente disseminados.
- Os plasmídeos dos grupos IncC (ST2) e IncI1 (ST12) sugerem estar associados aos genes *bla<sub>CMY-2</sub>*, *sul2* e *tet(A)* no sorotipo Heidelberg.
- A prevalência de fatores de virulência, associados à adesão bacteriana, invasão epitelial, produção de proteínas efetoras, captação de magnésio, sobrevivência e replicação em células hospedeiras e resistência sérica indicam um potencial patogênico desta sorovariedade em causar doença em humanos, assim como, o risco de sua presença em alimentos, animais e ambiente.
- A presença do ST15 identificada pelo MLST entre as linhagens estudadas reforça o domínio deste ST nesta sorovariedade em isolados do Brasil e mundialmente distribuídos, além de demonstrar a capacidade desta técnica em tipar linhagens em STs específicos.
- As técnicas de tipagem molecular como PFGE, SNPs e cgMLST demonstraram alta similaridade entre os isolados, os quais foram também agrupados geneticamente pela presença do gene *bla<sub>CMY-2</sub>*. Os resultados obtidos das metodologias de PFGE, cgMLST e a análise de

SNPs demonstraram uma alta similaridade entre os isolados estudados, revelando assim resultados concordantes entre si.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHESON, D.; HOHMANN, E. L. Nontyphoidal Salmonellosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 263–269, 15 jan. 2001.

ACHTMAN, M. et al. Multilocus Sequence Typing as a Replacement for Serotyping in *Salmonella enterica*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 6, p. e1002776, 21 jun. 2012.

ALIKHAN, N.-F. et al. Dynamics of *Salmonella enterica* and antimicrobial resistance in the Brazilian poultry industry and global impacts on public health. **PLOS Genetics**, v. 18, n. 6, p. e1010174, 2 jun. 2022.

ALLARD, M. W. et al. On the Evolutionary History, Population Genetics and Diversity among Isolates of *Salmonella Enteritidis* PFGE Pattern JEGX01.0004. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55254, 30 jan. 2013.

ALMEIDA, A. **Salmonella Heidelberg em aves e na saúde pública. 2018 - Trabalho de conclusão (Graduação)**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.

AMBLER, R. P. The structure of  $\beta$ -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 16 maio 1980.

ANDRADE, L. N. et al. Determinants of  $\beta$ -lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 399–407, maio 2010.

ANDRES, P. et al. Differential Distribution of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Clinical Enterobacteria with Unusual Phenotypes of Quinolone Susceptibility from Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2467–2475, jun. 2013.

ANTUNES, P. et al. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 110–121, fev. 2016.

ARGIMÓN, S. et al. Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. **Microbial Genomics**, v. 2, n. 11, 30 nov. 2016.

ARNOLD, B. J.; HUANG, I.-T.; HANAGE, W. P. Horizontal gene transfer and adaptive evolution in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 206–218, 12 abr. 2022.

ASTEN, A. J. A. M.; DIJK, J. E. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 251–259, jun. 2005.

AWAD, A. et al. Phenotypes, antibacterial-resistant profile, and virulence-associated genes of *Salmonella* serovars isolated from retail chicken meat in Egypt. **Veterinary World**, v. 13, n. 3, p. 440–445, 11 mar. 2020.

BACCI, C. et al. Phenotypic and genotypic features of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolated from chicken meat and chicken and quail carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 16–23, nov. 2012.

BATCHELOR, M. et al. Characterization of AmpC-Mediated Resistance in Clinical *Salmonella* Isolates Recovered from Humans during the Period 1992 to 2003 in England and Wales. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2261–2265, maio 2005.

BAUER, A. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v. 45(4), p. 493–496, 1966.

BÄUMLER, A. J. et al. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 317–322, jan. 1997.

BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *IpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 8, p. 2087–2097, abr. 1995.

BEARSON, B. L.; WILSON, L.; FOSTER, J. W. A Low pH-Inducible, PhoPQ-Dependent Acid Tolerance Response Protects *Salmonella typhimurium* against Inorganic Acid Stress. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 9, p. 2409–2417, maio 1998.

BEARSON, S. M. D.; BEARSON, B. L.; RASMUSSEN, M. A. Identification of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium genes important for survival in the swine gastric environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 4, p. 2829–2836, abr. 2006.

BEHLAU, I.; MILLER, S. I. A PhoP-repressed gene promotes *Salmonella typhimurium* invasion of epithelial cells. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 14, p. 4475–4484, jul. 1993.

BEKAL, S. et al. Usefulness of High-Quality Core Genome Single-Nucleotide Variant Analysis for Subtyping the Highly Clonal and the Most Prevalent *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Clone in the Context of Outbreak Investigations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 289–295, fev. 2016.

BHAVNANI, S. M. et al. Outcomes evaluation of patients with ESBL- and non-ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species as defined by CLSI reference methods: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 54, n. 3, p. 231–236, mar. 2006.

BOHNHOFF, M.; MILLER, C. P.; MARTIN, W. R. RESISTANCE OF THE MOUSE'S INTESTINAL TRACT TO EXPERIMENTAL SALMONELLA INFECTION. **Journal of Experimental Medicine**, v. 120, n. 5, p. 805–816, 1 nov. 1964.

BORGES, K. et al. **Caracterização fenotípica e molecular de cepas de *Salmonella Heidelberg* isoladas de fontes avícolas**. Porto Alegre, Brasil Anais do 5º Congresso e Feira Brasil Sul de Avicultura, Suinocultura e Laticínios: Feira de Equipamentos. Serviços e Inovação, , 2016.

BORTOLAIA, V. et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 12, p. 3491–3500, 1 dez. 2020.

BOYEN, F. et al. The fibronectin binding protein ShdA is not a prerequisite for long term faecal shedding of *Salmonella typhimurium* in pigs. **Veterinary Microbiology**, v. 115, n. 1–3, p. 284–290, 15 jun. 2006.

BRENNER, D.; FARMER, J. Enterobacteriales. Em: **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York, NY: Springer-Verlag, 2005. p. 587–607.

BRITO, G. P. et al. Febre Tifoide no Brasil: Fatores Determinantes / Typhoid Fever in Brazil: Determinant Factors. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 12399–12405, 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, mar. 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, jun. 1995.

CAMPOS, J. et al. Clinical *Salmonella* Typhimurium ST34 with metal tolerance genes and an IncHI2 plasmid carrying *oqxAB-aac(6')-Ib-cr* from Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 3, p. 843–845, mar. 2016.

CAMPOS, J. et al. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014-2015. **International journal of antimicrobial agents**, v. 51, n. 1, p. 151–154, jan. 2018.

CARATTOLI, A. et al. Characterization of Plasmids Carrying CMY-2 from Expanded-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Strains Isolated in the United States between 1996 and 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1269–1272, maio 2002.

CARATTOLI, A. et al. In Silico Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, jul. 2014.

CARATTOLI, A. et al. Contemporary IncI1 plasmids involved in the transmission and spread of antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae. **Plasmid**, v. 118, p. 102392, nov. 2021.

CARNELL, S. C. et al. Role in virulence and protective efficacy in pigs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium secreted components identified by signature-tagged mutagenesis. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1940–1952, 1 jun. 2007.

CASTELLANOS, L. R. et al. High Heterogeneity of *Escherichia coli* Sequence Types Harboring ESBL/AmpC Genes on IncI1 Plasmids in the Colombian Poultry Chain. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170777, 26 jan. 2017.

CAVACO, L. M. et al. qnrD , a Novel Gene Conferring Transferable Quinolone Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans Strains of Human Origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 603–608, fev. 2009.

CAVACO, L. M.; AARESTRUP, F. M. Evaluation of Quinolones for Use in Detection of Determinants of Acquired Quinolone Resistance, Including the New Transmissible Resistance Mechanisms qnrA , qnrB , qnrS , and aac (6') Ib-cr , in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* and Determinations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 9, p. 2751–2758, set. 2009.

CAVALLARO, E. et al. *Salmonella* Typhimurium Infections Associated with Peanut Products. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 7, p. 601–610, 18 ago. 2011.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2011**. Atlanta, GA.: [s.n.].

CDC. **Outbreak of *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Tyson Brand Mechanically Separated Chicken at a Correctional Facility (Final Update)**. Atlanta, GA: [s.n.].

CDC. **Multistate Outbreak of Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to Contact with Dairy Calves (Final Update)**. Atlanta, GA: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/salmonella/heidelberg-11-16/index.html>>.

CDC PULSENET. **Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC)**,



**Salmonella serotypes, Shigella sonnei and Shigella flexneri.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>>.

CEJAS, D. et al. First detection of CMY-2 plasmid mediated  $\beta$ -lactamase in Salmonella Heidelberg in South America. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 1, p. 30–33, jan. 2014.

CHEN, L. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Database issue, p. D325–D328, 17 dez. 2004.

CLSI. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests.** M02-A12. ed. [s.l: s.n.].

CORDEIRO, N. F. et al. Identification of the first blaCMY-2 gene in Salmonella enterica serovar Typhimurium isolates obtained from cases of paediatric diarrhoea illness detected in South America. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 3, p. 143–148, set. 2013.

CUCCURU, G. et al. Orione, a web-based framework for NGS analysis in microbiology. **Bioinformatics**, v. 30, n. 13, p. 1928–1929, 1 jul. 2014.

DARWIN, K. H.; MILLER, V. L. Molecular basis of the interaction of Salmonella with the intestinal mucosa. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 3, p. 405–28, jul. 1999.

DE OLIVEIRA GARCIA, D. et al. Multiclonal Outbreak of Klebsiella pneumoniae Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-2 and Novel Variant CTX-M-59 in a Neonatal Intensive Care Unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1790–1793, maio 2008.

DHANANI, A. S. et al. Genomic Comparison of Non-Typhoidal Salmonella enterica Serovars Typhimurium, Enteritidis, Heidelberg, Hadar and Kentucky Isolates from Broiler Chickens. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128773, 17 jun. 2015.

DIAS DE OLIVEIRA, S. et al. Antimicrobial resistance in Salmonella enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n. 3, p. 297–305, jan. 2005.

DORSEY, C. W. et al. Salmonella enterica serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. **Molecular Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 196–211, jul. 2005.

D'SOUZA, D. H.; CRITZER, F. J.; GOLDEN, D. A. Real-Time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection of *Salmonella* Using *inv A* Primers. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 9, p. 1097–1106, nov. 2009.

EAVES, D. J. et al. Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region of *gyrA* , *gyrB* , *parC* , and *parE* and Association with Antibiotic Resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 4012–4015, out. 2004.

EDIRMANASINGHE, R. et al. A Whole-Genome Sequencing Approach To Study Cefoxitin-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Various Sources. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, abr. 2017.

EGOROVA, S. et al. Ceftriaxone-Resistant *Salmonella enterica* Serotype Newport, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 954–957, jun. 2008.

EMBRAPA. **O agro no brasil e no mundo: uma síntese do período de 2000 a 2020.**

ENTEROBASE. **Details of assembly methods and in silico genotyping for Salmonella.** Disponível em: <<https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/pipelines/salmonella-statistics.html>>.

EWING, W. H.; EDWARDS, P. R. **Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae.** 4th ed ed. New York, NY: Elsevier Scientific Publishing Co, Inc, 1986.

FÀBREGA, A.; VILA, J. Salmonella enterica Serovar Typhimurium Skills To Succeed in the Host: Virulence and Regulation. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 308–341, abr. 2013.

FARDSANEI, F. et al. Antimicrobial resistance, virulence genes and genetic relatedness of Salmonella enterica serotype Enteritidis isolates recovered from human gastroenteritis in Tehran, Iran. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 220–226, mar. 2018.

FERNANDES, S. A. et al. CTX-M-2-Producing Salmonella Typhimurium Isolated from Pediatric Patients and Poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 15, n. 4, p. 317–321, dez. 2009.

FERNANDES, S. A. et al. Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases CTX-M-8 and CTX-M-2-Producing Salmonella Serotypes from Clinical and Nonhuman Isolates in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 5, p. 580–589, jul. 2017.

FERNANDES, S. A. et al. Salmonella enterica serotypes from human and nonhuman sources in Sao Paulo State, Brazil, 2004-2020. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, 2022.

FERRARI, R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance by genes qnrA1 and qnrB19 in Salmonella strains isolated in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 5, n. 06, p. 496–498, 20 jun. 2011.

FERRARI, R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and mutations in the topoisomerase genes of Salmonella enterica strains from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 657–662, 2013.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Virulence factors associated with Salmonella species. **Microbiological sciences**, v. 5, n. 11, p. 324–8, nov. 1988.

FINLAY, B. B.; GUMBINER, B.; FALKOW, S. Penetration of Salmonella through a polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cell monolayer. **The Journal of cell biology**, v. 107, n. 1, p. 221–30, jul. 1988.

FOLEY, S. L. et al. Population Dynamics of *Salmonella enterica* Serotypes in Commercial Egg and Poultry Production. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 13, p. 4273–4279, jul. 2011.

FOLSTER, J. P. et al. Characterization of bla<sub>CMY</sub>-Encoding Plasmids Among *Salmonella* Isolated in the United States in 2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 12, p. 1289–1294, dez. 2011.

FOSTER, J. W. Low pH Adaptation and the Acid Tolerance Response of *Salmonella typhimurium*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 215–237, 25 jan. 1995.

FRANCIS, C. L. et al. Ruffles induced by *Salmonella* and other stimuli direct macropinocytosis of bacteria. **Nature**, v. 364, n. 6438, p. 639–42, 12 ago. 1993.

GALÁN, J. E. Molecular genetic bases of *Salmonella* entry into host cells. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 263–271, abr. 1996.

GALÁN, J. E. *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 17, n. 1, p. 53–86, nov. 2001.

GALES, A. C. et al. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 1, p. 13–20, jan. 2002.

GALYOV, E. E. et al. A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. **Molecular Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 903–912, 20 set. 1997.

GARCÍA-DEL PORTILLO, F. *Salmonella* intracellular proliferation: where, when and how? **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14–15, p. 1305–1311, nov. 2001.

GERNER-SMIDT, P. et al. PulseNet USA: A Five-Year Update. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 9–19, mar. 2006.

GIBSON, D. L. et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 1131–1140, 1 abr. 2007.

GIRAUD, E.; BAUCHERON, S.; CLOECKAERT, A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 7, p. 1937–1944, jun. 2006.

GLENN, L. M. et al. Analysis of Antimicrobial Resistance Genes Detected in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated from Food Animals. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 3, p. 407–418, ago. 2011.

GONZALEZ-SANZ, R. et al. Emergence of extended-spectrum -lactamases and AmpC-type -lactamases in human *Salmonella* isolated in Spain from 2001 to 2005. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 6, p. 1181–1186, 1 dez. 2009.

GUO, L. et al. Regulation of Lipid A Modifications by *Salmonella typhimurium* Virulence Genes *phoP-phoQ*. **Science**, v. 276, n. 5310, p. 250–253, 11 abr. 1997.

HALLE, S. et al. Solitary Intestinal Lymphoid Tissue Provides a Productive Port of Entry for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 4, p. 1577–1585, abr. 2007.

HANNEMANN, S.; GALÁN, J. E. *Salmonella enterica* serovar-specific transcriptional reprogramming of infected cells. **PLoS pathogens**, v. 13, n. 7, p. e1006532, jul. 2017.

HANNING, I. B.; NUTT, J. D.; RICKE, S. C. Salmonellosis Outbreaks in the United States Due to Fresh Produce: Sources and Potential Intervention Measures. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 6, p. 635–648, jul. 2009.

HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 549–559, jun. 2001.

HENDRIKSEN, R. S. et al. Risk Factors and Epidemiology of the Ten Most Common Salmonella Serovars from Patients in Thailand: 2002–2007. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 8, p. 1009–1019, out. 2009.

HENSEL, M. et al. Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 163–174, out. 1998.

HIGGINS, P. G. et al. Development and evaluation of a core genome multilocus typing scheme for whole-genome sequence-based typing of *Acinetobacter baumannii*. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179228, 8 jun. 2017.

HOLT, K. E. et al. Pseudogene accumulation in the evolutionary histories of *Salmonella enterica* serovars Paratyphi A and Typhi. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 36, 2009.

HU, G.-Q. et al. Critical role for *Salmonella* effector SopB in regulating inflammasome activation. **Molecular Immunology**, v. 90, p. 280–286, out. 2017.

HUECK, C. J. et al. *Salmonella typhimurium* secreted invasion determinants are homologous to *Shigella* Ipa proteins. **Molecular Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 479–490, nov. 1995.

HUGHES, E. A.; GALÁN, J. E. Immune response to *Salmonella*: location, location, location? **Immunity**, v. 16, n. 3, p. 325–8, mar. 2002.

HUNTER, S. B. et al. Establishment of a Universal Size Standard Strain for Use with the PulseNet Standardized Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols: Converting the National Databases to the New Size Standard. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1045–1050, mar. 2005.

IGLESIAS, M. A. et al. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, v. 100, p. 96–101, out. 2017.

ILYAS, B.; TSAI, C. N.; COOMBES, B. K. Evolution of Salmonella-Host Cell Interactions through a Dynamic Bacterial Genome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, 29 set. 2017.

IMANISHI, M. et al. Typhoid fever acquired in the United States, 1999–2010: epidemiology, microbiology, and use of a space–time scan statistic for outbreak detection. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 11, p. 2343–2354, 27 ago. 2015.

JACOBY, G. A. AmpC  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161–182, jan. 2009.

JAJERE, S. M. A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. **Veterinary World**, v. 12, n. 4, p. 504–521, 6 abr. 2019.

KAAS, R. S. et al. Solving the Problem of Comparing Whole Bacterial Genomes across Different Sequencing Platforms. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104984, 11 ago. 2014.

KANASHIRO, A. et al. Serovars of Salmonella spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 7, n. 3, p. 195–198, set. 2005.

KAWASAKI, K.; ERNST, R. K.; MILLER, S. I. 3-O-Deacylation of Lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated Deacylase of Salmonella typhimurium, Modulates Signaling through Toll-like Receptor 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20044–20048, maio 2004.

KEELARA, S.; THAKUR, S. Dissemination of plasmid-encoded AmpC  $\beta$ -lactamases in antimicrobial resistant Salmonella serotypes originating from humans, pigs and the swine environment. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 1–2, p. 76–83, set. 2014.

KINGSLEY, R. A. et al. The shdA Gene Is Restricted to Serotypes of Salmonella enterica Subspecies I and Contributes to Efficient and Prolonged Fecal Shedding. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2720–2727, maio 2000.

KINGSLEY, R. A. et al. Salmonella enterica serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 895–905, fev. 2002a.

KINGSLEY, R. A. et al. Salmonella enterica serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 895–905, fev. 2002b.

KINGSLEY, R. A. et al. Molecular and Phenotypic Analysis of the CS54 Island of Salmonella enterica Serotype Typhimurium: Identification of Intestinal Colonization and Persistence Determinants. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 629–640, fev. 2003.

KINGSLEY, R. A. et al. Fibronectin Binding to the Salmonella enterica Serotype Typhimurium ShdA Autotransporter Protein Is Inhibited by a Monoclonal Antibody Recognizing the A3 Repeat. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 15, p. 4931–4939, ago. 2004.

KOHBATA, S.; YOKOYAMA, H.; YABUUCHI, E. Cytopathogenic effect of Salmonella typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. **Microbiology and immunology**, v. 30, n. 12, p. 1225–37, 1986.

KOHL, T. A. et al. Whole-Genome-Based Mycobacterium tuberculosis Surveillance: a Standardized, Portable, and Expandable Approach. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2479–2486, jul. 2014.

KUIJPERS, A. F. A. et al. Phenotypic Prediction: Linking in vitro Virulence to the Genomics of 59 Salmonella enterica Strains. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 9 jan. 2019.

LAROCK, D. L.; CHAUDHARY, A.; MILLER, S. I. Salmonellae interactions with host processes. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 191–205, 9 abr. 2015.

LARSEN, M. V. et al. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–1361, abr. 2012.

LEDEBOER, N. A. et al. Salmonella enterica serovar Typhimurium requires the Lpf, Pef, and Tafi fimbriae for biofilm formation on HEp-2 tissue



culture cells and chicken intestinal epithelium. **Infection and immunity**, v. 74, n. 6, p. 3156–69, jun. 2006.

LEE, C. A.; JONES, B. D.; FALKOW, S. Identification of a Salmonella typhimurium invasion locus by selection for hyperinvasive mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 5, p. 1847–1851, mar. 1992.

LEE, K. E. et al. Characterization of Nalidixic Acid-Resistant and Fluoroquinolone-Reduced Susceptible Salmonella Typhimurium in Swine. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 4, p. 610–615, 1 abr. 2011.

LEE, K.-E. et al. Plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamase (CMY-2) gene in Salmonella typhimurium isolated from diarrheic pigs in South Korea. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 329, 2 dez. 2014.

LEE, L. A. et al. Increase in Antimicrobial-Resistant Salmonella Infections in the United States, 1989-1990. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 1, p. 128–134, 1 jul. 1994.

LIANG, N. et al. Detection of Viable Salmonella in Lettuce by Propidium Monoazide Real-Time PCR. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, p. M234–M237, maio 2011.

LINDSEY, R. L. et al. Microarray-Based Analysis of IncA/C Plasmid-Associated Genes from Multidrug-Resistant Salmonella enterica. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6991–6999, out. 2011.

LITTLE, C. L. et al. Campylobacter and Salmonella in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern, 2003–2005. **Food Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 538–543, maio 2008.

LIU, B. et al. VFDB 2019: a comparative pathogenomic platform with an interactive web interface. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D687–D692, 8 jan. 2019.

LYNCH, M. F. et al. Typhoid Fever in the United States, 1999-2006. **JAMA**, v. 302, n. 8, p. 859, 26 ago. 2009.

LYNNE, A. M. et al. Characterization of Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Serotype Heidelberg Isolated from Food Animals. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 6, n. 2, p. 207–215, mar. 2009.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, mar. 2012.

MAIDEN, M. C. J. et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 6, p. 3140–3145, 17 mar. 1998.

MAIDEN, M. C. J. et al. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 728–736, 2 out. 2013.

MAPA. **Resistência aos Antimicrobianos.**

MARLOVITS, T. C. et al. Structural Insights into the Assembly of the Type III Secretion Needle Complex. **Science**, v. 306, n. 5698, p. 1040–1042, 5 nov. 2004.

MARTIN, L. C. et al. Characterization of bla CMY-2 Plasmids in *Salmonella* and *Escherichia coli* Isolates from Food Animals in Canada. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 4, p. 1285–1287, 15 fev. 2012.

MEDALLA, F. et al. Increased Incidence of Antimicrobial-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* Infections, United States, 2004–2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1662–1672, jun. 2021.

MENTZING, L. O.; RINGERTZ, O. SALMONELLA INFECTION IN TOURISTS. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 74, n. 3, p. 405–413, 17 ago. 2009.

MICHETTI, P. et al. Monoclonal secretory immunoglobulin A protects mice against oral challenge with the invasive pathogen *Salmonella typhimurium*. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 5, p. 1786–1792, maio 1992.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de Salmonella spp.: diagnóstico laboratorial do gênero Salmonella**. Brasília: Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz., 2011.

MONCRIEF, M. B. C.; MAGUIRE, M. E. Magnesium and the Role of mgtC in Growth of Salmonella typhimurium. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3802–3809, ago. 1998.

MONTE, D. F. et al. Genomic Features of High-Priority Salmonella enterica Serovars Circulating in the Food Production Chain, Brazil, 2000–2016. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 11058, 30 dez. 2019.

MORGAN, E. et al. Identification of host-specific colonization factors of Salmonella enterica serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 994–1010, 22 set. 2004.

MOUSSA, I. et al. Molecular characterization of Salmonella virulence genes isolated from different sources relevant to human health. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. Vol.11 (2), p. 197–201, 2013.

MURRAY, A. et al. Ciprofloxacin resistance in non-typhoidal Salmonella serotypes in Scotland, 1993–2003. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 110–114, 1 jul. 2005.

NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 917–919, 1 jan. 2017.

NADON, C. et al. PulseNet International: Vision for the implementation of whole genome sequencing (WGS) for global food-borne disease surveillance. **Eurosurveillance**, v. 22, n. 23, 8 jun. 2017.

NADON, C. A. et al. Development and application of MLVA methods as a tool for inter-laboratory surveillance. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 35, 29 ago. 2013.

NEUMANN, B. et al. A Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme for Enterococcus faecalis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 3, mar. 2019.

NORRIS, T. L.; BAUMLER, A. J. Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 23, p. 13393–13398, 9 nov. 1999.

OCHMAN, H. et al. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 15, p. 7800–7804, 23 jul. 1996.

OLIVEIRA, S. D. et al. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, v. 87, n. 1, p. 25–35, jun. 2002.

OLSEN, J. E. et al. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. applications in investigations of salmonellosis among livestock. **Veterinary Quarterly**, v. 15, n. 4, p. 125–135, dez. 1993.

ONWUEZOBE, I. A.; OSHUN, P. O.; ODIGWE, C. C. Antimicrobials for treating symptomatic non-typhoidal *Salmonella* infection. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 14 nov. 2012.

PACE, J.; HAYMAN, M. J.; GALÁN, J. E. Signal transduction and invasion of epithelial cells by *S. typhimurium*. **Cell**, v. 72, n. 4, p. 505–14, 26 fev. 1993.

PAVIA, A. T. et al. Epidemiologic Evidence that Prior Antimicrobial Exposure Decreases Resistance to Infection by Antimicrobial-Sensitive *Salmonella*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 2, p. 255–260, 1 fev. 1990.

PEIRANO, G. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 305–309, 30 maio 2006.

PÉREZ-MORENO, M. O. et al.  $\beta$ -Lactamases, transferable quinolone resistance determinants, and class 1 integron-mediated antimicrobial resistance in human clinical *Salmonella enterica* isolates of non-Typhimurium serotypes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 1, p. 25–31, jan. 2013.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153–2162, jun. 2002.

PHOEBE LOSTROH, C.; LEE, C. A. The Salmonella pathogenicity island-1 type III secretion system. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 14–15, p. 1281–1291, nov. 2001.

PIDDOCK, L. J. V. Ciprofloxacin resistance in salmonella serotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 26, n. 6, p. 853–853, 1990.

PIDDOCK, L. J. V. Fluoroquinolone resistance in Salmonella serovars isolated from humans and food animals. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 3–16, mar. 2002.

POPOFF, M.; LE MINOR, L. Genus XXXIII. Salmonella Lignieres 1900, 389AL. Em: 2ND ED, VOL 2, PART B. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. New York, NY: Springer-Verlag, 2005. p. 764–799.

QUE, J. U.; CASEY, S. W.; HENTGES, D. J. Factors responsible for increased susceptibility of mice to intestinal colonization after treatment with streptomycin. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 1, p. 116–123, jul. 1986.

QUINN, F. Cellular Microbiology, 2nd ed. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1330–1330, ago. 2005.

RABELLO, R. F. et al. Antimicrobial Resistance in Farm Animals in Brazil: An Update Overview. **Animals**, v. 10, n. 4, p. 552, 26 mar. 2020.

RAHMAN, M. M.; GUARD-PETTER, J.; CARLSON, R. W. A virulent isolate of Salmonella enteritidis produces a Salmonella typhi-like lipopolysaccharide. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 7, p. 2126–2131, abr. 1997.

REBOLLEDO, J. et al. International outbreak investigation of Salmonella Heidelberg associated with in-flight catering. **Epidemiology and Infection**, v. 142, n. 4, p. 833–842, 26 abr. 2014.

ROCHA, F. R. et al. High Frequency of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Nosocomial Strains Isolated

from a Teaching Hospital in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 6, p. 909–914, jul. 2019.

RODICIO, M. R. et al. Acquisition of antimicrobial resistance determinants by virulence plasmids specific for nontyphoid serovars of *Salmonella enterica*. **Reviews in Medical Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 55–65, jul. 2011.

RODRIGUES, I. et al. Amoxicillin / Clavulanic Acid and Cefotaxime Resistance in *Salmonella Minnesota* and *Salmonella Heidelberg* from Broiler Chickens. **Poultry Science Journal**, v. 5, n. 2, p. 123–129, 2017.

RODRÍGUEZ, I. et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamases in ceftiofur-resistant *Salmonella enterica* isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003–07. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 2, p. 301–309, ago. 2009.

ROHDE, R. [Serological integration of all known Arizona-species into the Kauffmann-White-scheme (author's transl)]. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Erste Abteilung Originale. Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie**, v. 243, n. 2–3, p. 148–76, abr. 1979.

ROSSOLINI, G. M. Acquired Metallo-  $\beta$ -Lactamases: An Increasing Clinical Threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. 11, p. 1557–1558, 1 dez. 2005.

ROWLANDS, R. E. G. et al. PREVALENCE OF DRUG RESISTANCE AND VIRULENCE FEATURES IN *Salmonella* spp. ISOLATED FROM FOODS ASSOCIATED OR NOT WITH SALMONELLOSIS IN BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 461–467, dez. 2014.

RUBY, T. et al. *Salmonella*'s long-term relationship with its host. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 3, p. 600–615, maio 2012.

RYAN, C. A. et al. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. **JAMA**, v. 258, n. 22, p. 3269–74, 11 dez. 1987.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **The Quarterly Review of Biology**, v. 3, n. 76, p. 348–349, 2001.

SCALLAN, E. et al. Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 7–15, jan. 2011.

SCHLUMBERGER, M. C.; HARDT, W.-D. Salmonella type III secretion effectors: pulling the host cell's strings. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 46–54, fev. 2006.

SCHÜRCH, A. C. et al. Whole genome sequencing options for bacterial strain typing and epidemiologic analysis based on single nucleotide polymorphism versus gene-by-gene-based approaches. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 24, n. 4, p. 350–354, abr. 2018.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.

SEIFFERT, S. N. et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: An emerging problem for human health? **Drug Resistance Updates**, v. 16, n. 1–2, p. 22–45, fev. 2013.

SELSTED, M. E. et al. Enteric defensins: antibiotic peptide components of intestinal host defense. **Journal of Cell Biology**, v. 118, n. 4, p. 929–936, 15 ago. 1992.

SHAH, D. H. et al. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, v. 157, n. 5, p. 1428–1445, 1 maio 2011.

SHEA, J. E. et al. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 6, p. 2593–2597, 19 mar. 1996.

SILVEIRA, L. et al. Characterization of Multidrug-Resistant Isolates of *Salmonella enterica* Serovars Heidelberg and Minnesota from Fresh Poultry Meat Imported to Portugal. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 1, p. 87–98, 1 jan. 2021.

SMITH, R. L.; MAGUIRE, M. E. Microbial magnesium transport: unusual transporters searching for identity. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 2, p. 217–226, abr. 1998.

SOUZA, A. I. S. et al. High occurrence of  $\beta$ -lactamase-producing Salmonella Heidelberg from poultry origin. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0230676, 31 mar. 2020.

STEELE-MORTIMER, O. The Salmonella-containing vacuole: moving with the times. **Current opinion in microbiology**, v. 11, n. 1, p. 38–45, fev. 2008.

STEVENSON, J. E. et al. Increase in Nalidixic Acid Resistance among Non-Typhi Salmonella enterica Isolates in the United States from 1996 to 2003. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 195–197, jan. 2007.

SU, L.-H. et al. Antimicrobial Resistance in Nontyphoid Salmonella Serotypes: A Global Challenge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, n. 4, p. 546–551, 15 ago. 2004.

TANNOCK, G. W.; SAVAGE, D. C. Indigenous microorganisms prevent reduction in cecal size induced by Salmonella typhimurium in vaccinated gnotobiotic mice. **Infection and Immunity**, v. 13, n. 1, p. 172–179, jan. 1976.

TAO, T. et al. Magnesium transport in Salmonella typhimurium: mgtA encodes a P-type ATPase and is regulated by Mg<sup>2+</sup> in a manner similar to that of the mgtB P-type ATPase. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 10, p. 2654–2662, maio 1995.

TAO, T. et al. Magnesium transport in Salmonella typhimurium: biphasic magnesium and time dependence of the transcription of the mgtA and mgtCB loci. **Microbiology**, v. 144, n. 3, p. 655–664, 1 mar. 1998.

TAVECHIO, A. T. et al. Changing patterns of Salmonella serovars: increase of Salmonella Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 38, n. 5, p. 315–322, out. 1996.



TIBA-CASAS, M. R. et al. Emergence of CMY-2-Producing Salmonella Heidelberg Associated with IncI1 Plasmids Isolated from Poultry in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 2, p. 271–276, mar. 2019.

TINDALL, B. J. et al. Nomenclature and taxonomy of the genus Salmonella. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 521–524, 1 jan. 2005.

TOLLENTINO, F. M. et al. High Prevalence of bla CTX-M Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in Klebsiella pneumoniae Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of bla SHV-12 , bla SHV-31 , bla SHV-38 , and bla CTX-M-15 in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 1, p. 7–16, mar. 2011.

TURNER, P. J. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, n. s4, p. S273–S275, 15 ago. 2005.

VAN DEN BERG, R. R. et al. Characterization and whole genome sequencing of closely related multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Heidelberg isolates from imported poultry meat in the Netherlands. **PLOS ONE**, v. 14, n. 7, p. e0219795, 22 jul. 2019.

VASQUES, M. R. G. et al.  $\beta$ -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a cardiac intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 28–33, fev. 2011.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 406–414, 4 dez. 2009.

WATSON, P. R. et al. Characterization of intestinal invasion by Salmonella typhimurium and Salmonella dublin and effect of a mutation in the invH gene. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2743–2754, jul. 1995.

WATTIAU, P.; BOLAND, C.; BERTRAND, S. Methodologies for Salmonella enterica subsp. enterica Subtyping: Gold Standards and Alternatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 22, p. 7877–7885, 15 nov. 2011.

WEENING, E. H. et al. The Salmonella enterica serotype Typhimurium lpf, bcf, stb, stc, std, and sth fimbrial operons are required for intestinal

persistence in mice. **Infection and immunity**, v. 73, n. 6, p. 3358–66, jun. 2005.

WEILL, F.-X. et al. Ciprofloxacin-resistant *Salmonella* Kentucky in Travelers. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1611–1612, out. 2006.

WHICHARD, J. M. et al. Human *Salmonella* and Concurrent Decreased Susceptibility to Quinolones and Extended-Spectrum Cephalosporins. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, p. 1681–1688, nov. 2007.

WHO. **ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance**. Switzerland: [s.n.].

WOOD, M. W. et al. Structural analysis of *Salmonella enterica* effector protein SopD. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1698, n. 2, p. 219–226, maio 2004.

WOZNIAK, C. E.; CHEVANCE, F. F. V.; HUGHES, K. T. Multiple Promoters Contribute to Swarming and the Coordination of Transcription with Flagellar Assembly in *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 18, p. 4752–4762, 15 set. 2010.

YANG, B. et al. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 228–235, jul. 2013.

YEOM, J.; SHAO, Y.; GROISMAN, E. A. Small proteins regulate *Salmonella* survival inside macrophages by controlling degradation of a magnesium transporter. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 33, p. 20235–20243, 18 ago. 2020.

YI, L. et al. *mcr-1*-Harboring *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Sequence Type 34 in Pigs, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 2, p. 291–295, fev. 2017.

YOON, H. et al. Coordinated Regulation of Virulence during Systemic Infection of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 2, p. e1000306, 20 fev. 2009.

ZANKARI, E. et al. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 771–777, 1 abr. 2013.

ZHANG, H. et al. Type I interferon remodels lysosome function and modifies intestinal epithelial defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 47, p. 29862–29871, 2020.

ZHANG, S. et al. The Salmonella enterica Serotype Typhimurium Effector Proteins SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 Act in Concert To Induce Diarrhea in Calves. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 7, p. 3843–3855, jul. 2002.

ZHANG, S. et al. Molecular Pathogenesis of Salmonella enterica Serotype Typhimurium-Induced Diarrhea. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 1–12, jan. 2003.

ZHANG, S. et al. Salmonella Serotype Determination Utilizing High-Throughput Genome Sequencing Data. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 5, p. 1685–1692, maio 2015.

ZHAO, S. et al. Antimicrobial Resistance in *Salmonella enterica* Serovar Heidelberg Isolates from Retail Meats, Including Poultry, from 2002 to 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6656–6662, nov. 2008.

ZOU, M.; KEELARA, S.; THAKUR, S. Molecular Characterization of Salmonella enterica Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 3, p. 232–238, mar. 2012.

## Anexo 1 Preparo de Soluções

### Soluções para PFGE

#### Tris 1 M, pH 8,0

- Tris base 121,1 g
- H<sub>2</sub>O dest 800 mL
- HCl 42 mL
- H<sub>2</sub>O Ultra Pura q.s.p 1000 mL

Autoclavar

#### EDTA 0,5M, pH 8,0

- EDTA 93,06 g
- H<sub>2</sub>O dest 300 mL
- Ajustar pH ± 10 g de NaOH
- H<sub>2</sub>O Ultra pura q.s.p 500 mL

Autoclavar

#### Tampão de Suspensão Celular – Cell Suspension Buffer – CSB (100mM Tris, 100mM EDTA, pH 8,0)

- Tris 1 M pH 8,0 10 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 20 mL
- H<sub>2</sub>O Ultra pura estéril q.s.p 100 mL

#### Tampão de lise celular – Cell Lysis Buffer – CLB (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0, 10% sarcosil)

- Tris 1 M pH 8,0 25 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 50 mL
- Sarcosyl 10% 50 mL
- H<sub>2</sub>O Ultra pura estéril q.s.p 500 mL

### **Sarcosyl (N-lauroilsarcosina, sal dissódico) a 10%**

- Sarcosyl (Sigma) 10 g
- H<sub>2</sub>O Ultra pura 90 mL

Adicionar cuidadosamente o Sarcosyl à água em um recipiente estéril e dissolver suavemente por aquecimento a 50-60°C. (Utilizar máscara para pesar).

### **Agarose para plug - PFGE (Seakem Gold ®)**

- 1,2 g pulsed field certified agarose – ultra pure DNA grade agarose
- 100 mL TEA

### **Agarose para eletroforese - PFGE (Seakem Gold ®)**

- 1,0 g agarose pulsed field electrophoresis: running gel (Sigma)
- 100 mL H<sub>2</sub>O ultra pura

### **Tampão Tris Borato (TBE)**

#### **TBE 5X [ ]**

- Ácido bórico 27,5 g
- Tris base 54,0 g
- EDTA 0,5 M pH 8,0 20 mL
- H<sub>2</sub>O Ultra pura estéril q.s.p 1000 mL

#### **TBE 10X [ ]**

- Ácido bórico 55 g
- Tris base 108,0 g
- EDTA 0,5 M pH 8,0 40 mL
- H<sub>2</sub>O Ultra pura estéril q.s.p 1000 mL

#### **TBE 0,5 X [ ] (1000 mL)**

- 50 mL de TBE 10X
- 950 mL de água destilada

### **Tampão TEA (Tris 10mM: EDTA 1mM, pH 8,0)**

- Tris-HCl 1 M, pH 8,0                      10 mL
- EDTA 0,5 M, pH 8,0                      2mL
- H<sub>2</sub>O Ultra pura estéril q.s.p            1000 mL

Nota: O TE é usado para a preparação da agarose Seaken Gold e para lavar os plugs após a lise.

### **Proteinase K (20 mg/mL)**

- Proteinase K em pó
- H<sub>2</sub>O Ultra pura

Dissolver, distribuir em tubos eppendorf e armazenar a – 20°C (Utilizar máscara de proteção para pesagem). Quantidade a ser pesado depende do fabricante.

### **Brometo de Etídio**

- Solução estoque = 10 mg/mL
- Diluir 1:10.000 com H<sub>2</sub>O Ultra pura (10 µL em 100 mL de H<sub>2</sub>O), concentração final

### **NaOH a 0.2 N (100 µL)**

- Água destilada ultrapura e livre de DNase e RNase (Thermo Fisher Scientific) = 80 µL
- NaOH 1N = 20 µL

## Anexo 2

Perfis fenotípicos e genotípicos de resistência a antimicrobianos dos 32 isolados estudados de S. Heidelberg.

Isolado	Cidade	Sítio de Origem	Fonte	Perfis fenotípicos de resistência	Perfis genotípicos de resistência*1
005_10	São Paulo	Sangue	Humano	-	<i>aac(6')-laa</i>
098_10	São Paulo	Ave	Carcaça	AMP (I)/CTX /S/TE (I)	<i>bla<sub>CTX-M-2</sub>, aac(6')-laa, aadA1, sul1</i> <i>bla<sub>TEM-1B</sub>, aac(3)-Via, aac(6')-laa, aph(6)-Id,</i> <i>aph(3'')-Ib, aadA1, tet(A), gyrA, parC, sul2, sul1</i>
462_10	Santos	Fezes	Humano	AMP/CN/S/TE/NA/PEF/S3	<i>aph(3'')-Ib, aadA1, tet(A), gyrA, parC, sul2, sul1</i>
400_11	São Paulo	Ave	Carcaça	-	<i>aac(6')-laa, parC*3</i>
133_12	Campinas	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2,</i> <i>qnrB19</i>
195_12	Londrina	Ave	Carcaça	TE/NA/PEF/S3	<i>aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
443_12	São Paulo	Urina	Humano	S/CIP/NA/PEF	<i>aac(6')-laa, gyrA, parC*2, qnrB19</i>
555_12	Florianópolis	Suabe de arrasto	Superfície de granja	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
010_13	Campinas	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/S/NA/PEF	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, gyrA, parC</i>
295_13	São Paulo	Urina	Humano	NA/PEF/S3 (I)	<i>aac(6')-laa, gyrA, parC*2</i>
219_14	São Paulo	Alimento	Não Humano	S/TE/NA/PEF/S3	<i>aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
246_14	São Paulo	Alimento	Não Humano	AMP/AMC/CTX/ CRO (I)/FOX/CAZ/S/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2,</i> <i>qnrB19</i>
248_14	São Paulo	Alimento	Não Humano	AMP/AMC/FOX/CAZ/CN/S/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
260_14	São Paulo	Urina	Humano	NA	<i>aac(6')-laa, gyrA, parC*2</i>

Isolado	Cidade	Sítio de Origem	Fonte	Perfis fenotípicos de resistência	Perfis genotípicos de resistência*1
305_14	Campinas	Ave	Carcaça	TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
306_14	Campinas	Suabe de arrasto	Superfície de granja	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ATM (I)/TE/ CIP (I)/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2, qnrB19</i>
309_14	Campinas	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ATM (I)/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2, qnrB19</i>
312_14	São Paulo	Alimento	Não Humano	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
163_15	São Paulo	Alimento	Não Humano	TE/NA/PEF/S3	<i>aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
251_15	Uberlândia	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO (I)/FOX/CAZ/S (I)/TE/ CIP (I)/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
029_16	São Paulo	Alimento	Não Humano	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
061_16	São Paulo	Alimento	Não Humano	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
093_16	São Paulo	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ATM (I)/ S (I)/TE/CIP (I)/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
143_16	Londrina	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO (I)/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
148_16	São Paulo	Alimento	Não Humano	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ATM (I)/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
149_16	São Paulo	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>



Isolado	Cidade	Sítio de Origem	Fonte	Perfis fenotípicos de resistência	Perfis genotípicos de resistência*1
148_17	Londrina	Suabe de arrasto	Não Humano	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
019_18	São Paulo	Alimento	Não Humano	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ ATM (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
007_20	Campinas	Secreção abscesso perianal	Humano	CN/S/TE/NA/PEF/S3	<i>aac(3)-Via. aac(6')-laa, aadA1, tet(A), gyrA, parC, sul2, sul1</i>
074_20	Campinas	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>
140_20	São Paulo	Ave	Carcaça	AMP/AMC (I)/FEP (I)/CTX/CRO/CAZ (I)/ ATM (I)/CN/S/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CTX-M-2</sub>, aac(3)-Via, aac(6')-laa, aadA1, tet(A), gyrA, parC, sul2, sul1</i>
134_21	Campinas	Ave	Carcaça	AMP/AMC/CTX/CRO/FOX/CAZ/ S (I)/TE/NA/PEF/S3	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, aac(6')-laa, tet(A), gyrA, parC, sul2</i>

Em relação a identificação dos isolados o número após o *underline* é referente ao ano abreviado de isolamento das cepas.

(i), perfil intermediário de resistência.

AMP, Ampicilina; AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; FEP, Cefepime; CTX, Cefotaxime; CRO, Ceftriaxona; FOX, Cefoxitina; CAZ, Ceftazidime; ATM, Aztreonam; IPM, Imipenem; CN, Gentamicina; AK, Amicacina; S, Estreptomicina; TE, Tetraciclina; CIP, Ciprofloxacina; NA, ácido nalidíxico; PEF, Pefloxacina; SXT - Sulfametoxazol-trimetoprima; S3, Sulfonamida; C, Cloranfenicol.

\*1 Dentre os isolados que apresentaram mutações pontuais quase todas foram em *gyrA* (p.S83F), *parC* (p.T57S) salvo as exceções \*2.

\*2 Os isolados 443\_12, 295\_13 e 260\_14 não apresentaram a mutação pontual no gene *gyrA* (p.S83F), e sim mutações pontuais nos genes *gyrA* (p.A119E), *gyrA* (p.D87G), *parC* (p.S80R) e *parC* (p.T57S).

\*3 O isolado 400\_11 apresentou mutação pontual apenas no gene *parC* (p.T57S).

### Anexo 3

Metadados e perfil genotípico de resistência a  $\beta$ -lactâmicos dos isolados selecionados do *Enterobase*.

<b>Assembly Barcode</b>	<b>Ano</b>	<b>País</b>	<b>Fonte</b>	<b>Perfis genotípicos de resistência a <math>\beta</math>-lactâmicos</b>
SAL_AB5254AA_AS	2018	<i>United States</i>	Ambiente	-
SAL_BB8677AA_AS	2005	<i>United States</i>	Ambiente	-
SAL_CA1049AA_AS	2015	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_CA1396AA_AS	2005	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_CA1403AA_AS	2012	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_CA1467AA_AS	2012	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_CA1483AA_AS	2008	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_CA1517AA_AS	2006	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_CA1596AA_AS	2011	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_CA2542AA_AS	2002	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_CA2576AA_AS	2013	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_CA3569AA_AS	2012	<i>Colombia</i>	Aves	-
SAL_CA5118AA_AS	2011	<i>United States</i>	Ambiente	-
SAL_CA5299AA_AS	2003	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_FB0403AA_AS	2013	<i>Chile</i>	Ambiente	-
SAL_FB6641AA_AS	2015	<i>Brazil</i>	Ambiente	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_FB6670AA_AS	2016	<i>Brazil</i>	Ambiente	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_FB9735AA_AS	2017	<i>Brazil</i>	Ambiente	-
SAL_HA7270AA_AS	2006	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_HB8944AA_AS	2015	<i>Brazil</i>	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_HC4729AA_AS	2016	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_HC4731AA_AS	2014	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_HC4733AA_AS	2015	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_HC5151AA_AS	2011	<i>Brazil</i>	Aves	-
SAL_IA3876AA_AS	2008	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_IA3927AA_AS	2007	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_IA4709AA_AS	2013	<i>United States</i>	Aves	-

<b>Assembly Barcode</b>	<b>Ano</b>	<b>País</b>	<b>Fonte</b>	<b>Perfis genotípicos de resistência a β-lactâmicos</b>
SAL_JA7490AA_AS	2003	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_JA9082AA_AS	2004	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_KA2787AA_AS	2009	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_KA3382AA_AS	2010	<i>Canada</i>	Alimento	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_KA4362AA_AS	2010	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_KA9367AA_AS	2009	<i>United States</i>	Ambiente	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>
SAL_KA9607AA_AS	2007	<i>United States</i>	Ambiente	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_KB0839AA_AS	2012	<i>Venezuela</i>	Aves	-
SAL_KB8011AA_AS	2007	<i>England</i>	Animal Selvagem	-
SAL_KB8354AA_AS	2006	<i>Netherlands</i>	Aves	<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>
SAL_KB8634AA_AS	2006	<i>Netherlands</i>	Aves	-
SAL_LA5198AA_AS	2001	<i>United States</i>	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_LA6345AA_AS	1997	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_LA6346AA_AS	2002	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_LA6715AA_AS	2000	<i>United States</i>	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub></i>
SAL_NB7892AA_AS	2003	<i>Austria</i>	Aves	-
SAL_NB8067AA_AS	2013	<i>Brazil</i>	Aves	-
SAL_NB8072AA_AS	2014	<i>Brazil</i>	Aves	-
SAL_SC2419AA_AS	2021	<i>Brazil</i>	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_SC8565AA_AS	1987	<i>United States</i>	Aves	-
SAL_SC8570AA_AS	1988	<i>United States</i>	Alimento	-
SAL_VC4557AA_AS	2007	<i>Algeria</i>	Aves	-
SAL_VC4562AA_AS	2003	<i>France</i>	Alimento	-
SAL_XB8433AA_AS	2013	<i>Portugal</i>	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_XB8435AA_AS	2013	<i>Portugal</i>	Aves	-
SAL_XB8455AA_AS	2014	<i>Portugal</i>	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_XB8459AA_AS	2013	<i>Portugal</i>	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>

<b>Assembly Barcode</b>	<b>Ano</b>	<b>País</b>	<b>Fonte</b>	<b>Perfis genotípicos de resistência a <math>\beta</math>-lactâmicos</b>
SAL_XB8463AA_AS	2018	Portugal	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_XB8464AA_AS	2018	Portugal	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_XB8465AA_AS	2018	Portugal	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_XB8477AA_AS	2017	Portugal	Aves	-
SAL_XB8480AA_AS	2018	Portugal	Aves	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>
SAL_XC5914AA_AS	2020	Brazil	Aves	-
SAL_YA2151AA_AS	2016	Argentina	Aves	-
SAL_YA2152AA_AS	2016	Argentina	Aves	-
SAL_YA2153AA_AS	2016	Argentina	Aves	-
SAL_YA2154AA_AS	2016	Argentina	Aves	-